

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Oxidativní stres u bakterií –
s důrazem na modelový organismus *Escherichia coli***

**Oxidative stress in bacteria –
with an emphasis on the model organism of *Escherichia coli***

Andrea Moravcová

Školitel: RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 7. 5. 2018

.....

Podpis

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala RNDr. Ireně Liché, CSc., za věnovaný čas, trpělivost a vlídné vedení.

Abstrakt

Většina bakteriálních druhů se během svého života setká s aerobními podmínkami, které pro ně mohou být toxické. Tím se dostávají do stavu oxidativního stresu. Toxicita aerobního prostředí vyplývá z chemických vlastností molekulárního kyslíku a jeho reaktivních druhů (ROS). Aby si bakterie zajistily přežití a prosperitu, musely se těmto podmínkám v minulosti přizpůsobit. Tato práce se přednostně věnuje oxidativně stresovým adaptacím u nejprostudovanějšího bakteriálního modelu – *Escherichia coli*. Jsou zde popsány adaptace na úrovni regulace transkripce, translace i metabolismu s důrazem na molekulární mechanismy. Hlavním adaptačním mechanismem proti oxidativnímu stresu je jednak deaktivace ROS, dále pak oprava poškozených struktur (makromolekul). Tyto enzymové aktivity jsou regulovány globálně několika transkripčními regulátory. Velmi dobře jsou prostudovány transkripční regulátory OxyR a SoxRS u *E. coli*. Tyto regulátory jsou konzervovány napříč bakteriálním spektrem, což ale neznamená, že u všech organismů zastávají stejnou funkci. To je důvod, proč byly do této práce zahrnuty i jiné více či méně prostudované bakterie - *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* - a představen jejich způsob využití nejen těchto, ale i jiných, pro tyto bakterie specifických, transkripčních regulátorů.

Klíčová slova: oxidativní stres, aerobní metabolismus, ROS, OxyR, SoxRS, RpoS. *E. coli*

Abstract

Most bacterial species encounter aerobic conditions during their life, which can be toxic. This leads to a state of oxidative stress. Toxicity of aerobic environment results from the chemical properties of molecular oxygen and its reactive species (ROS). Bacteria had to adapt to these conditions in the past to ensure preservation and prosperity. This thesis is preferably focused on oxidative stress adaptations in the most elaborated bacterial model – *Escherichia coli*. Regulation of adaptations at the regulation of transcription, translation and metabolism level are described with emphasis on molecular mechanisms. The main adaptation mechanism against oxidative stress is the deactivation of ROS, as well as the repair of damaged cell structures (macromolecules). These enzyme activities are regulated by several transcriptional regulators. The transcriptional regulators OxyR and SoxRS have been well studied in *E. coli*. Even though these regulators are conserved across the bacterial spectrum, they may not have the same function in all organisms. For this reason, also other, more or less studied bacterial species – *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* – were included in this thesis. The various strategies of how these bacteria use not only OxyR and SoxRS but also others, for these bacteria specific transcriptional regulators, are presented herein.

Key words: oxidative stress, aerobic metabolism, ROS, OxyR, SoxRS, RpoS, *E. coli*

Seznam zkratek

AAA+	ATPáza asociovaná s různými buněčnými aktivitami
ABC	ATP vazebný transportní protein
AceA	Isocitrát lyáza
AceB	Malát syntáza
Acn	Aconitáza
AcrAB	Efluxní systém
ADP	Adenosin difosfát
Ahp	Alkylhydroperoxid reduktáza
AraC/XylS	Proteinová rodina transkripčních aktivátorů
ArcA/ArcB	Systém pro kontrolu aerobní respirace
ArcZ	Malá regulační RNA regulující hladinu RpoS
ATP	Adenosin trifosfát
CatA	Kataláza A
CatR	Negativní regulátor transkripce genů pro katalázu A
ClpXP	Na ATP závislá proteáza
DHAD	Dihydroxyacid dehydratáza
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
DNAP	DNA polymeráza
Dps	DNA vazebný protein z hladovějící buňky
DUF	Proteinová doména s neznámou funkcí
FADH	Flavinadenindinukleotid
FAPY	Formamidopyrimidine
FeoABC	Transportní systém železa
FinR	Regulátor genu <i>fpr</i>
FldA	Flavodoxin
FMN	Flavinmononukleotid
Fpr	Ferredoxin NADP(H) reduktáza
Fum	Fumaráza
Fur	Regulátor příjmu železa
G6PDH	Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza
GorA	Glutathion reduktáza
GrxA	Glutharedoxin

GS	Glyoxylátová zkratka
HexR	Transkripční regulátor typu HTH
HP	Hydroperoxidáza
HTH	Helix-turn-helix DNA vazebná doména
IraP, IraD, IraM	Anti-adaptérové proteiny inhibující aktivitu RssB
LTTR	Transkripční regulátory typu LysR
MerR	Odolnost vůči rtuti
MexGHI-OmpD	Víceúčelový efluxní systém
MntH	Importér manganu
MrgA	Homolog proteinu Dps u <i>Bacillus subtilis</i>
mRNA	Mediátorová RNA
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
Nfo	Enzym pro opravu DNA
OxyR	Regulon odpovědi na peroxid vodíku
OxyS	Malá regulační RNA regulující hladinu RpoS
P5CDH	$\Delta 1$ -pyrroline-5-karboxylát dehydrogenáza
PA2274	Gen kódující enzym monooxygenázu
PA3718	Gen kódující efluxní pumpu
PerR	Regulátor detekce peroxidu vodíku
PFOR	Pyruvát flavodoxin oxidoreduktáza
PQ	Paraquat
PRODH	Prolin dehydrogenáza
PutA	Enzym, který obsahuje prolin dehydrogenázovou (PRODH) a $\Delta 1$ -pyrroline-5-karboxylát dehydrogenázovou doménu (P5CDH)
PutP	Transportér prolinu
RES	Reaktivní elektrofilní druhy
RHH	Ribbon-helix-helix DNA vazebná doména
RNA	Kyselina ribonukleová
RNAP	RNA polymeráza
ROS	Reaktivní druhy kyslíku
RpoS	Transkripční faktor obecné stresové odpovědi
RssB	Regulátor RpoS
RhyB	Malá nekódující RNA s regulační funkcí

SOD	Superoxid dismutáza
SoxRS	Regulon odpovědi na superoxidový radikál
sRNA	Malá regulační RNA
TCA	Krebsův cyklus
tRNA	Transferová RNA
YaaA	Protein pro odpověď na peroxid vodíku
YggX	Enzym pro opravu Fe-S klastrů proteinů

OBSAH

ÚVOD	1
1 PODSTATA OXIDATIVNÍHO STRESU	2
1.1 ŽIVOT V AEROBNÍM PROSTŘEDÍ	2
1.2 VNITŘNÍ ZDROJE KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ	3
1.2.1 Superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$)	4
1.2.2 Peroxid vodíku (H_2O_2)	6
1.2.3 Hydroxylový radikál (HO^{\cdot})	7
1.3 VNĚJŠÍ ZDROJE KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ	7
2 BAKTERIÁLNÍ ADAPTACE NA OXIDATIVNÍ STRES U <i>ESCHERICHIA COLI</i>	10
2.1 ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY	10
2.1.1 Inaktivace superoxidového radikálu	10
2.1.2 Inaktivace peroxidu vodíku	10
2.2 ADAPTACE NA ÚROVNI REGULACE TRANSKRIPCE	11
2.2.1 Regulon OxyR	12
2.2.2 Regulon SoxRS	15
2.2.3 Příjem železa a jeho regulace prostřednictvím Fur	18
2.2.4 Regulon RpoS	19
2.3 ADAPTACE NA ÚROVNI REGULACE TRANSLACE	21
2.4 REGULACE NA ÚROVNI METABOLISMU	21
2.4.1 Glyoxylátová zkratka	21
3 ALTERNATIVNÍ SYSTÉMY	23
3.1 PERR U <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	23
3.2 OXYR A SOXR U <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	24
3.2.1 Regulátor SoxR	24
3.2.2 Regulátor OxyR	24
3.3 CATR U <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i>	25
3.4 FINR A HEXR U <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>	26
3.4.1 Regulátor FinR	26
3.4.2 Regulátor HexR	26
ZÁVĚR	28
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	29

Úvod

Mikroorganismy vznikly ve zcela anaerobním prostředí, které předcházelo progresivnímu okysličování atmosféry aktivitou fotosyntetických cyanobakterií. Toxicita aerobního prostředí vychází z chemických vlastností molekulárního kyslíku a jeho reaktivních druhů (ROS). Působením ROS dochází k devastujícímu poškození buněčných struktur (makromolekul), a proto se bakterie na tuto situaci musely adaptovat. Pro zajištění přežití a maximální prosperity vznikly bakteriální adaptace na více úrovních. Jedná se o adaptace na úrovni regulace transkripce, translace a metabolismu.

Ačkoli je těmto adaptačním mechanismům nejlépe porozuměno u modelového organismu *E. coli*, obdobné mechanismy nalézáme u širokého spektra bakteriálních druhů. Může se jednat o znaky homologní či analogní. V případě homologie pochází znaky od společného předka, přičemž se funkce jednotlivých znaků může lišit vlivem divergentní evoluce. Analogické znaky jsou výsledkem konvergentní evoluce, což znamená, že se znaky liší původem svého vzniku, ale jejich struktura nebo funkce je shodná. Často je velmi obtížné určit, zda jde o homologii či analogii.

Cílem této práce je popsat bakteriální adaptace na podmínky oxidativního stresu na úrovni regulace transkripce, translace i metabolismu u gramnegativní enterobakterie *E. coli*. Srovnání s dalšími bakteriemi - *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* - je důležitou součástí této práce, hlavně z hlediska předvídatelnosti regulačních mechanismů, které jsou u *E. coli* velmi dobře prostudovány a evolučně konzervovány u mnoha bakteriálních druhů.

Výzkum v posledních letech přinesl nové poznatky zejména v reakci na oxidativní stres na úrovni regulace translace a metabolismu. Tyto dráhy představují slibný cíl pro vývoj nových antibiotik.

Téma oxidativního stresu u bakterií se stává aktuálním zejména z důvodu jeho potencionální role ve vzniku perzistence u patogenních bakterií, což je v dnešní době intenzivně zkoumáno. Důvodem je zejména role perzisterů v selhávání terapie chronických infekcí.

1 Podstata oxidativního stresu

1.1 Život v aerobním prostředí

Mikroorganismy a jejich metabolické dráhy se vyvinuly v anaerobní fázi historie této planety, která trvala nejméně 2 miliardy let. Ve své redukované formě, která je relativně rozpustná, bylo přítomno železo, jež svými vlastnostmi bylo vhodné jako kofaktor mnoha enzymů. Proto biochemické dráhy vznikaly na základě chemických vlastností tohoto prvku [1]. Podmínky primitivní Země silně kontrastovaly s dnešní podobou atmosféry. Během historie naší planety se v průběhu asi 4,5 miliardy let chemické vlastnosti atmosféry i oceánů významně změnily z redukčního na oxidační prostředí. Složení původní atmosférické složky bylo určováno převážně vulkanickými plyny, které obsahovaly množství vodíku (H_2), oxidu uhličitého (CO_2) a oxidu uhelnatého (CO), sulfanu (H_2S), methanu (CH_4) a řady dalších redukčních anorganických sloučenin [2].

Po progresivní akumulaci kyslíku v biosféře, což se stalo na základě rozšíření fotosynteticky aktivních cyanobakterií, se organismy musely přizpůsobit této nové situaci, jelikož toxicita kyslíku představovala riziko ohrožující život. Fotosyntéza je jediným významným zdrojem volného kyslíku v ovzduší Země, ale i přes desetiletí intenzivního výzkumu nevíme, kdy se tento metabolismus vyvinul. Časový průběh akumulace kyslíku je tedy stále diskutován [3]. Vyvinuly se různé specifické i nespecifické adaptace, které zajistily přežití a prosperitu mikroorganismů. Formy adaptace závisely vždy na konkrétních podmínkách prostředí [4].

Některé mikroorganismy unikají oxidativnímu stresu setrváním v anaerobním prostředí. Obligátně anaerobní organismy nedokáží tolerovat kyslík vůbec. Mikroaerofilní organismy vyžadují velmi nízké koncentrace kyslíku. Fakultativně anaerobní organismy dokáží využívat aerobní i kvasný metabolismus v závislosti na podmínkách prostředí. Všechny tyto mikroorganismy trpí zpomaleným růstem, zvýšenou mutagenezí, nebo dokonce úhynem, pokud jsou vystaveny vyšším koncentracím kyslíku, než které jsou pro ně optimální [5].

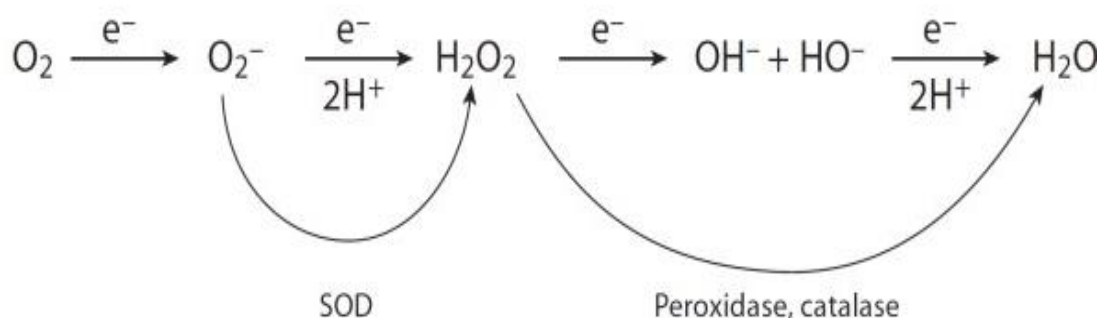
Molekulární mechanismy a fyziologické důsledky oxidativního stresu byly po desetiletí podrobovány rozsáhlému výzkumu, většinou na výzkumném modelu *Escherichia coli*, z něhož je z velké části odvozeno naše chápání bakteriální oxidativní stresové reakce.

1.2 Vnitřní zdroje kyslíkových radikálů

Kyslík je malá nepolární molekula, která může volně procházet biologickou membránou [6]. Struktura kyslíku v základním stavu, který je esenciálním prvkem pro život všech aerobních organismů, je přitom právě pro tyto aerobní organismy potenciálně nebezpečná. Atmosférický kyslík obsahuje dva nepárové elektrony se stejným spinem. To znamená, že molekula kyslíku podléhá redukci jednomocnou drahou. Pauliho princip říká, že dva elektrony nemohou obsazovat stejný orbital, pokud nemají opačný spin. Z tohoto principu vyplývá, že nepárové elektrony v molekule kyslíku obsazují samostatné orbitály. Přijetí elektronu tedy vyžaduje, aby jeden ze stávajících nepárových elektronů změnil svůj spin za vzniku singletového kyslíku, což je relativně pomalý proces. Singletový kyslík je excitovaná a vysoce reaktivní forma kyslíku [7].

Redukční potenciál kyslíku je mírně negativní (-0,16 V), tudíž jeho afinita je pro přijetí prvního elektronu velmi nízká. Kyslík může přijímat elektrony pouze od jednomocných zdrojů elektronů, jimiž jsou např. centra kovů, flaviny a chinony. Vhodné jednomocné zdroje elektronů mají stejně jako kyslík nízký redukční potenciál. Tyto kofaktory přenášejí elektrony v dýchacím řetězci. Postupně vznikají nebezpečné reaktivní intermediáty (ROS), k nimž náležejí superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a vysoce reaktivní hydroxylový radikál (HO^{\cdot}). ROS poškozují všechny buněčné makromolekuly a bez adekvátní odpovědi by byl aerobní život zcela nemožný [8].

Molekula kyslíku musí přijmout od výše zmíněných jednomocných zdrojů elektronů 4 elektrony a 4 protony, aby proběhla kompletní redukce kyslíku na vodu. Přijetím prvního elektronu vzniká superoxidový radikál. Přijetím druhého elektronu a dvou protonů vzniká peroxid vodíku. Přijetím třetího elektronu vzniká hydroxylový radikál. Konečně - přijetím čtvrtého elektronu a dvou protonů vzniká molekula vody [7]. Schéma redukční dráhy je zobrazeno na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Jednoelektronová redukce molekulárního kyslíku na vodu. (Převzato z [7])

2.1.1 Superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Superoxidový radikál je nabitá molekula, která nemůže penetrovat přes biologickou membránu, takže stres způsobený superoxidovým radikálem vzniká na základě vnitrobuněčných procesů [9]. Je velmi nestabilní a spontánně dismutuje na $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Tuto reakci mohou katalyzovat buněčné enzymy: superoxid dismutázy (SODs), které udržují hladiny superoxidového radikálu na nízkých úrovních. V redukčním prostředí buněčného cytosolu se superoxid chová jako oxidant, kdežto v oxidačním prostředí by se choval jako redukční činidlo [7].

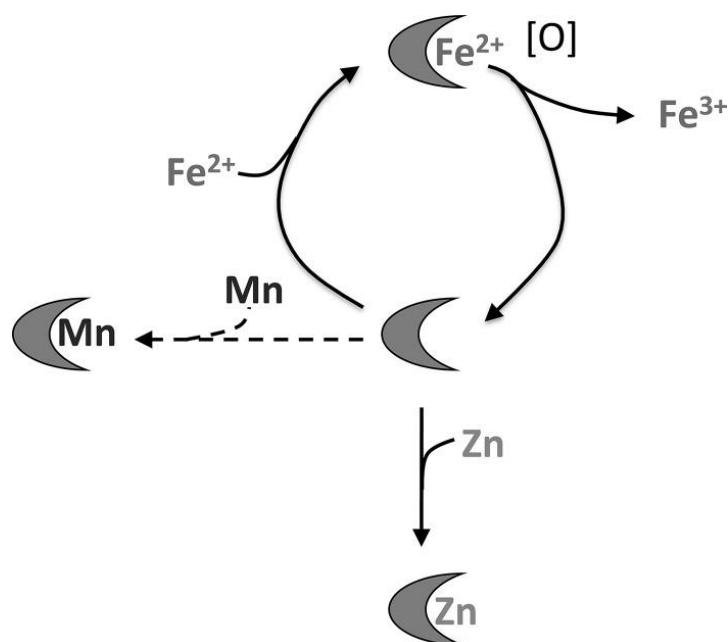
Superoxid působí především na Fe-S klastry proteinů. Jejich oxidací dojde k inaktivaci těchto proteinů [10]. Toto poškození se týká dehydratáz, jejichž klastry nejsou ochráněny polypeptidem před působením ROS, které pro svou aktivitu potřebují přímý kontakt s klastrem [11]. Jedná se například o katalytický [4Fe-4S] klastr hydroxyacid dehydratázy (DHAD). Tento klastr slouží k vazbě α,β -dihydroxyacid substrátů a přímo se podílí na dehydratačních reakcích [12]. DHAD je jen jedním členem této skupiny dehydratáz a bylo zjištěno, že ostatní členy jsou stejně citlivé. K nim řadíme též aconitázu B a fumarázu A, které se účastní Krebsova cyklu (TCA) [10]. Avšak i enzymy, které ochranný peptid obsahují, mohou být v ohrožení, pokud jsou buňky vystavovány stresu po více generací [13]. Důvodem je oxidativní poškození systému Isc, který je v normálních podmínkách zodpovědný za přenos [4Fe-4S] klastrů nově syntetizovaným apoenzymům [14]. Oxidativně stresové podmínky mají potenciál zablokovat krok donorství síry do biogeneze [4Fe-4S] klastrů. *E. coli* to řeší indukcí

systému Suf, který je schopen tuto funkci zcela zastoupit a je na působení ROS méně citlivý než Isc systém. Oba tyto systémy sdílí strukturní, nikoliv však sekvenční podobnost – jsou to homodimerní enzymy, které fungují podobnými mechanismy pro sestavení [4Fe-4S] klastrů [15].

Poškození enzymů, které se účastní TCA, vysvětluje neschopnost SOD mutantů růst na substrátech, jako je sukcinát a acetát [16, 17]. Totéž se potvrdilo ve studiích, které se zabývaly SOD mutanty *Saccharomyces* [18]. V rámci specifické odpovědi (SoxS) mohou být tyto citlivé enzymy nahrazeny rezistentními izoenzymy: aconitázou A a fumarázou C, přičemž dojde k obnovení TCA [17, 19].

Proteiny s oxidovanými klastry mají tendenci k denaturaci a uvolnění Fe^{2+} , který se může následně podílet na Fentonově reakci, při které vzniká vysoce reaktivní hydroxylový radikál (viz kapitola 1.2.3). Oxidovaný enzym může být reaktivován buněčným Fe^{2+} , což je poměrně rychlý proces, a aktivita reaktivovaného enzymu je vysoká. Nicméně v rámci každého opravného cyklu vznikne subfrakce enzymu, které je chybně dodán Zn^{2+} , čímž vzniká nedostatečně aktivní enzym. *Escherichia coli* kompenzuje ztrátu aktivitou thiolu, což je -SH skupina na postranním řetězci aminokyselin, jejíž oxidací vznikají disulfidické můstky. Tento proces vede k odstranění zinku a importu manganu na katalytické místo. Mangan je rezistentní k aktivitě ROS a zajišťuje dostatečnou enzymovou aktivitu [4]. Schéma děje je zobrazeno na obrázku č. 2.

Import manganu do buňky je zajištěn importérem MntH. Gen *MntH* je pod kontrolou regulátoru Fur (detailně v kapitole 2.2.3) a je indukován po vyčerpání železa [20]. Bakterie se mohou bránit oxidativnímu stresu tím, že zvýší zastoupení manganu v enzymech [21].



Obrázek č. 2: Výměna oxidovaného Fe^{2+} za Zn^{2+} a Mn^{2+}

Superoxidový radikál oxiduje v proteinech vázané železo na Fe^{3+} , který disociuje a zanechává za sebou neaktivní apoprotein. Reaktivace buněčným Fe^{2+} je rychlá a aktivita enzymu v ustáleném stavu je vysoká. Nicméně u každého cyklu vznikne subfrakce proteinů, které je dodán Zn^{2+} . Tím vznikne enzym s nedostatečnou aktivitou. Záměnou za Mn^{2+} se plně obnovuje enzymová aktivita. (Zdroj obrázku: [4])

2.1.2 Peroxid vodíku (H_2O_2)

Peroxid vodíku je malá nenabitá molekula, která může volně procházet biologickou membránou [9]. Nejedná se v pravém slova smyslu o volný radikál, neboť je relativně stabilní. Avšak v přítomnosti tranzitních kovů (například dvojmocného železa) může být redukován na hydroxylový radikál ($\text{HO}\cdot$) a hydroxylový iont (OH^-). Tento proces je znám jako Fentonova reakce [22]. Nejvýraznějším efektem působení H_2O_2 je inaktivace dvou rodin enzymů, které obsahují železo: neredoxní mononukleární enzymy a dehydratázy obsahující $[\text{4Fe-4S}]$ klastr. Poškození se tedy týká stejných enzymů jako při působení superoxidového radikálu, ale chemie se liší. V případě peroxidu vodíku vychází z Fentonovy reakce:



Udržení nízké intracelulární hladiny H_2O_2 je velmi obtížné v prostředí, které obsahuje extracelulární zdroje H_2O_2 [23, 24].

2.1.3 Hydroxylový radikál (HO^\bullet)

Jedná se o extrémně silný radikál, nejreaktivnější ze zmíněných intermediátů. Reaguje se vším, co se nachází v jeho blízkosti, může oxidovat každou biologickou molekulu a je limitován pouze rychlostí difúze. Stejně jako superoxidový radikál a peroxid vodíku může vázat a oxidovat katalytický atom železa z klastru dehydratáz. Hydroxylový radikál poškozuje DNA, v níž modifikuje purinové a pyrimidinové báze. Nejvíce poškozovanou bází je guanin, protože jeho nižší redoxní potenciál dovoluje elektronům, aby se vmezeřily do elektronových děr. Jedním z nejčastějších produktů je 8-hydroxyguanin, který může párovat s adeninem, aniž by při replikaci byla chyba detekována DNA polymerázou (DNAP) [25]. Oxidace thyminu produkuje nekódující léze, což způsobuje blokaci DNAP [26]. Obdobně oxidace ribózových skupin vytváří jednořetězcové zlomy blokující DNAP. Rychlost poškození DNA se zvyšuje, jsou-li zvýšeny hladiny železa při Fentonově reakci.

Při poškození DNA je oprava nezbytně nutná. Glykosyláza FAPY, endonukleáza IV a VIII iniciují excizi oxidovaných bází [27-29]. Tyto enzymy nejsou specifické na konkrétní léze. Spíše skenují helikální narušení, což umožňuje odstranění mnoha chybně inkorporovaných bází. Exonukleáza III a endonukleáza IV vystříhnou zlomy ribózových skupin a dojde k obnovení primeru pro opravnou DNAP [26]. Pokud tento excizní systém selže, k opravě může dojít post-replikační rekombinací. Jakmile selžou oba tyto opravné systémy, spustí se SOS systém, který je ale velmi náchylný k chybám. Jedná se však o poslední možnost, jak opravit DNA.

Žádný opravný mechanismus DNA nespadá pod regulony specifických adaptací. Důvodem je, že buňka řeší opravu DNA až po odstranění původce oxidativního stresu [30].

1.3 Vnější zdroje kyslíkových radikálů

Toxicitu kyslíkových radikálů využívají kompetitoři v rámci mikrobiálního prostředí. Například bakterie mléčného kvašení generují peroxid vodíku, jehož exkreci používají k usmrcení okolních mikroorganismů. Peroxid vodík, který je jedním z ROS, je pro tento cíl ideální [31], jelikož jde o malou nenabitou molekulu, která může volně procházet biologickou membránou cílového organismu a nemůže být vyloučena [9].

Využití ROS bylo prokázáno i v rámci imunitní odpovědi eukaryotického organismu v boji proti přítomnému patogenu. Po pohlcení bakterie fagocytující buňkou dojde k aktivaci na NADPH závislé oxidázy v makrofázích, což vyvolává produkci vysokých koncentrací

superoxidového radikálu, který spontánně dismutuje na peroxid vodíku [32]. V neutrofilních buňkách enzym myeloperoxidáza přemění peroxid vodíku na kyselinu chlornou (HOCl), která může usmrtit bakterii v rámci fagosomu [33]. HOCl funguje jako dvouelektronové oxidační činidlo a poškozuje DNA a postranní řetězce proteinů, což vede k jejich nevratné denaturaci [34].

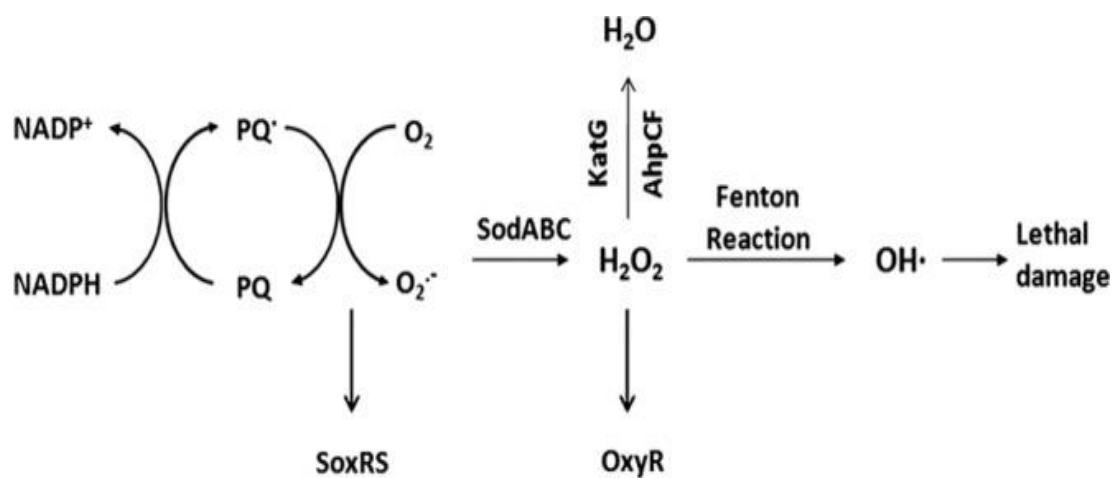
Poškození podléhají rovněž chaperony, proteiny, které se podílejí na sbalování a opravě ostatních proteinů. Jsou to ATP-ázy, které jsou nespecifické k určitým ligandům. Poškození chaperonů může nastat buď denurací, nebo degradací intracelulární ATP, která je pro správnou funkci chaperonů nezbytná [35]. Mikroorganismy se na stres způsobený HOCl adaptovaly tím, že produkují protein Hsp33 (heat shock protein), což je chaperon, jehož aktivita je na intracelulárním ATP nezávislá [36]. Hsp33 ochraňuje buněčné proteiny před nevratnou agregací. Existují regulátory genové exprese, které jsou zodpovědné za reakci na stres způsobený kyselinou chlornou, a tak umožňují zvýšit životaschopnost bakteriální buňky; RclR [38], NemR [39], HypR [40] a HypT [41]. Jedná se o regulátory obsahující reaktivní thiolovou skupinu na cysteinu, jejíž oxidace slouží k detekci HOCl. Touto oxidací dojde ke strukturní změně detekčního proteinu a k následné upregulaci transkripce příslušných detoxifikačních genů. Existence různých regulátorů poukazuje na závažnost poškození, které způsobuje kyselina chlorná [42].

Taktéž působení některých antibiotik způsobuje bakteriím oxidativní stres. Po aplikaci antibiotik (beta-laktamová či fluorochinolonová antibiotika) byla u bakterií zjištěna zvýšená exprese genů - regulonů oxidativního stresu. Působením těchto antibiotik dochází ke zpomalení respirace, což vede ke zrychlení vedlejších reakcí spojených s tvorbou ROS. Zpomalením metabolismu dochází k akumulaci ADP, jelikož nedochází k jeho utilizaci. Změna v poměru ATP/ADP je indikátorem nerovnováhy mezi produkcí a spotřebou energie [43].

Jiné studie potvrzují baktericidní účinek antibiotik i v anaerobních podmínkách. To poukazuje na skutečnost, že vznik ROS není sám o sobě podstatou hynutí bakterií působením antibiotik, ale jde o souhru více mechanismů [44].

Navzdory škodlivosti ROS může mít mírný oxidativní stres pozitivní vliv na adaptaci bakterií k antibiotikům. Předpřípravení bakteriálních buněk organickou látkou generující ROS, například paraquatem (PQ), zvyšuje pravděpodobnost vzniku perzistentních buněk při následném vystavení letální dávce antibiotika. Metabolická dráha, která byla spuštěna PQ, je popsána na obrázku č. 3. Perzisteři jsou dormantní fenotypové varianty běžných buněk, které

jsou tolerantní k antibiotikům a mají důležitou roli v selhávání terapie chronických infekcí. Perzisteři jsou produkováni stochasticky v populaci vystavené antibiotikům [45].



Obrázek č. 3: Transkripční a metabolická kaskáda indukovaná paraquatem (PQ). (Převzato z [45])

2 Bakteriální adaptace na oxidativní stres u *Escherichia coli*

2.2 Antioxidační enzymy

2.2.1 Inaktivace superoxidového radikálu

Specifická stresová odpověď *E. coli* na superoxidový radikál a peroxid vodíku je zprostředkována indukcí enzymů superoxid dismutáz (SODs) a kataláz (HP) [46]. Superoxidový radikál je aktivitou SODs přeměněn na peroxid vodíku [47]. *E. coli* má tři isotypy SODs: dva cytoplasmatické enzymy MnSOD (*sodA*) a FeSOD (*sodB*) a jeden periplasmatický enzym CuZnSOD (*sodC*).

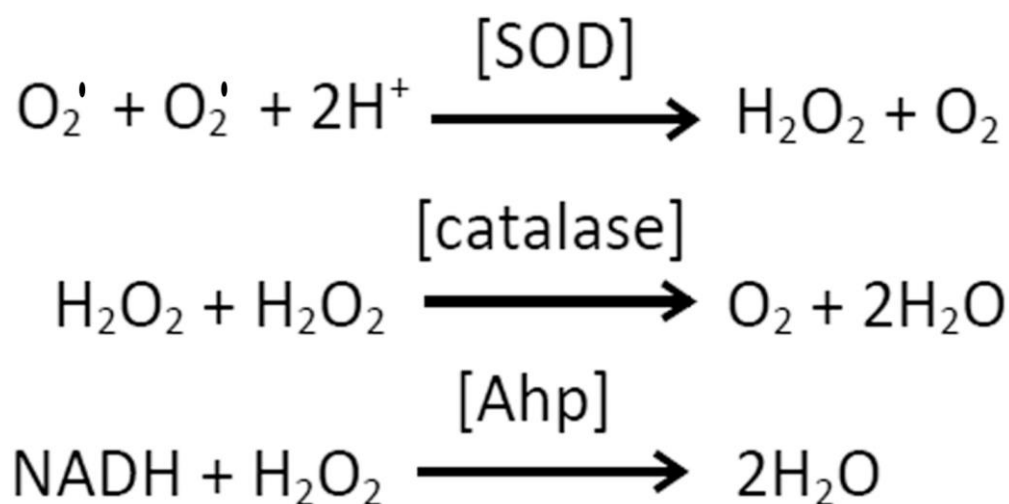
Přítomnost periplasmatické SOD u gramnegativních patogenních bakterií naznačuje, že se tento enzym vyvinul na ochranu před exogenními zdroji superoxidového radikálu, jako je například oxidativní vzplanutí ve fagocytech. Její přítomnost v některých nepatogenních bakteriích (včetně *E. coli*) ukazuje, že tato SOD má svou úlohu i při normálních růstových podmínkách. Gen *sodC* je jedním z mnoha antioxidačních genů, které jsou indukovány RpoS sigma faktorem (detailně v kapitole 2.2.4) ve stacionární fázi růstu bakteriální buňky [48].

Cytoplasmatické SODs vykazují dostatečnou aktivitu k udržení superoxidového radikálu v rovnovážném stavu v sub-nanomolárních koncentracích [49]. FeSOD a MnSOD jsou izoenzymy a jejich zastoupení v buňce je regulováno hladinou železa. Regulátor Fur (ferric uptake regulator) blokuje syntézu MnSOD, když je hladina železa vysoká. V opačném případě je stimulována syntéza MnSOD a zároveň aktivována transkripce RyhB, což je malá RNA (sRNA), která zodpovídá za degradaci FeSOD [50]. Regulátor Fur také zajišťuje import manganu indukcí manganového importéru MntH [20]. Syntéza MnSOD je indukována také tehdy, pokud jsou přítomna antibiotika generující superoxidový radikál (viz obrázek č. 4) [51].

2.2.2 Inaktivace peroxidu vodíku

Byly identifikovány tři hlavní enzymy pro inaktivaci peroxidu vodíku: alkylhydroperoxid reduktáza (Ahp), hydroperoxidáza I (*katG*) a hydroperoxidáza II (*katE*). Ahp je dvoukomponentová peroxidáza obsahující reaktivní skupinu thiolu na cysteinu, která přenáší elektrony z NADH na peroxid vodíku, čímž dojde k jeho redukci na vodu. *AphCF* a *katG* jsou silně indukovány OxyR při stresu exogenním peroxidem vodíku. *KatE* je ve stacionární fázi růstu silně indukována transkripčním faktorem RpoS, který je detailně popsán v kapitole 2.2.4 [52]. Při nízkých koncentracích peroxidu vodíku je aktivní Ahp, zatímco při vysokých

koncentracích fungují katalázy. Katalázy by při nízkých koncentracích peroxidu vodíku tvořily ferrylový radikál, který je silným oxidačním činidlem, jenž by poškodil okolní polypeptidy. Aktivita Aph je limitována rychlostí poskytnutí NADH metabolismem. Nasycení Aph nastává při překročení určité intracelulární koncentrace peroxidu vodíku (20 mikromolů). V takovém případě fungují katalázy, které pro svou aktivitu elektrony od NADH nevyžadují [53].



Obrázek č. 4: Aktivita antioxidačních enzymů

Aktivitou SOD dochází k dismutaci superoxidového radikálu na peroxid vodíku. Aktivitou kataláz dochází k přeměně peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Dodáním elektronů od NADH dochází aktivitou Ahp k přeměně peroxidu vodíku na vodu. (Převzato z [54])

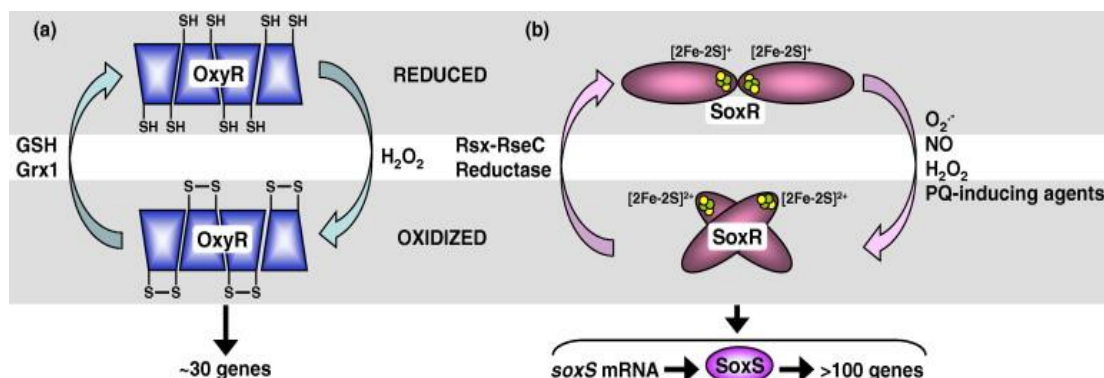
Antioxidační enzymy jsou součástí regulonů OxyR, SoxRS i RpoS (viz kapitola 2.3). Ačkoli je *E. coli* používána jako běžný model, tyto regulony byly studovány i u dalších bakteriálních skupin [55].

2.3 Adaptace na úrovni regulace transkripce

U *E. coli* bylo doposud nalezeno několik hlavních regulonů, které se aktivují během oxidativního stresu. Jsou to zejména systémy OxyR, SoxRS a RpoS. Termín regulon je pojmenováním pro soubor genů, které jsou společně indukovány jako odpověď na signál či stres a který je kontrolován specifickým regulačním proteinem. V přítomnosti peroxidu vodíku a superoxidového radikálu jsou oxidovány transkripční regulátory OxyR a SoxRS, čímž podstoupí konformační změny. RpoS je sigma faktor obecné stresové odpovědi a je indukován

i jinými stresy či hladověním. Žádný ze systémů není aktivován fyziologickými hladinami superoxidového radikálu a peroxidu vodíku [56].

Navzdory obrovské diverzitě v bakteriálních genomech jsou stresové odpovědi typické pro *E. coli* funkčně konzervovány také v různých dalších bakteriálních skupinách, což ukazuje na pozitivní selekci ve prospěch těchto regulátorů [55].



Obrázek č. 5: Oxidace a redukce hlavních stresových regulátorů u *E. coli*: OxyR (a) a SoxRS (b). (Převzato z [56])

2.3.1 Regulon OxyR

Regulon OxyR je hlavním regulonem pro odpověď na přítomnost H_2O_2 . Je regulován transkripčním regulátorem OxyR, který je členem rodiny LTTR. Jedná se o 34 kDa velký protein, který se formuje do homotetrameru a který má C koncovou DNA vazebnou doménu helix-turn-helix (HTH), jež je pro LTTR rodinu běžná. Regulon OxyR řídí aktivitu téměř čtyřiceti genů, které chrání buňku před toxicitou způsobenou H_2O_2 [57].

Indukce transkripce z příslušných promotorů nastane, když je protein OxyR v oxidovaném stavu [58]. Redukovaná a oxidovaná forma OxyR se tedy od sebe strukturně liší [59]. Protein OxyR obsahuje velmi reaktivní thiol na Cys199, který je oxidován na kyselinu sulfonovou (Cys-SOH). Dochází k vytvoření intramolekulárního disulfidického můstku mezi Cys199 a Cys208 [59]. Schéma děje je detailně zachyceno na obrázku č. 5 (a). Mutace v těchto konzervovaných cysteinových zbytcích vede k neschopnosti proteinu OxyR reagovat na přítomnost peroxidu vodíku. V oxidovaném stavu protein OxyR rozpoznává čtyři ATAG elementy se vzdáleností 10 párů bází, což dovolu je podjednotkám proteinu OxyR vazbu na 4 velké žlaby po jedné straně dvoušroubovice DNA. Redukovaný protein OxyR váže pouze dva velké žlaby [60].

Oxidovaná forma proteinu OxyR se váže na DNA a zároveň interaguje s β podjednotkou RNA polymerázy (RNAP), čímž pozitivně reguluje transkripci z příslušných promotorů regulonu včetně *katG* (HPI), *ahpCF* (alkylhydroperoxidáza), *dps* (gen pro DNA vazebný protein z hladovějící buňky), *gorA* (glutathion reduktáza), *grxA* (glutatharedoxin) a *oxyS* (regulační RNA). Po skončení oxidačního stresu na OxyR závislé proteiny GorA a GrxA navrácí protein OxyR do jeho redukované formy. Jedná se tedy o autoregulaci [61].

Thiol (Cys 199) proteinu OxyR může reagovat i na přítomnost reaktivních elektrofilů (RES) (chinony, aldehydy, epoxidy, diamidy a další). Elektrofilů jsou kladně nabitě chemické skupiny sloučenin, které přijímají elektronový pár od nukleofilů a současně takto spolu tvoří chemickou vazbu. RES mohou reagovat s thioley na cysteinech různých proteinů za tvorby disulfidických můstků, což vede k nevratné agregaci a vyčerpávání thiolů v proteomu. Schopnost reagovat na RES ukazuje na multifunkčnost systému OxyR u *E. coli*, jelikož jiné bakterie k tomu využívají samostatné systémy [62].

Jedním z proteinů regulonu OxyR je protein Dps, který má duální biochemickou funkci: ferroxidázovou aktivitu a vazbu na DNA. Ferroxidázovou aktivitou zpomaluje Fentonovu reakci sekvestrací volného železa, což podstatně snižuje poškození DNA, zvláště ve spolupráci s proteiny Fur a Yaa (viz dále). Interakce mezi Dps a DNA vede ke kondenzaci DNA do vysoce uspořádané krystalické struktury [63]. Studie z roku 2015 prokázala, že tyto dvě funkce proteinu Dps jsou sice biochemicky oddělitelné, ale fungují společně kvůli zachování integrity DNA a životaschopnosti bakteriální buňky [64].

Mutanty bez Dps trpí při vystavení peroxidu vodíku rozsáhlým poškozením DNA. Dps je konzervován u více než 300 bakteriálních druhů [65]. Přestože je u *E. coli* Dps součástí regulonu OxyR, je exprimován do určité míry jak v exponenciální fázi růstu buňky, tak ve stacionární fázi, kdy je pod regulací RpoS [66]. Přítomnost Dps zvyšuje šanci přežívání bakterie v různých stresových situacích včetně hladovění, teplotního či oxidačního stresu. Dps má také určitou roli při formaci biofilmu [67].

Krystalografické studie ukázaly, že Dps se tvaruje do sférického dvanáctičlenného homo-oligomeru s dutinou. Vnitřní i vnější povrch Dps je stejně jako povrch DNA kvůli zápornému náboji fosfátových skupin negativně nabitý. Z podstaty věci by se tedy tyto dvě molekuly měly odpuzovat, ale N-koncové domény každého monomeru Dps se rozprostírají směrem ven a obsahují několik lysinů (kladně nabitě aminokyseliny), které by mohly přispět k vazbě na DNA vzhledem k jejich opačnému elektrostatickému náboji. Dřívější studie

uvažovaly o jednoduché elektrostatické interakci mezi Dps a DNA bez jakékoli specifické sekvence či jiné strukturní specifity [64].

Recentní studie z roku 2017 odhalila, že vazba na DNA neprobíhá zcela náhodně [68]. Dps má tendenci v genomu vázat místa, která mají lokálně zvýšenou „koncentraci“ DNA a poskytují platformu pro maximální počet N-konců proteinu Dps [69]. Například ohyb DNA nebo Hollidayova struktura mohou být pro tento účel vhodnými kandidáty. Vazebná místa pro Dps jsou obohacena invertovanými nebo přímými repetitivy, které v důsledku interakcí s komplementárními sekvencemi na stejném nebo opačném vlákně mohou vytvářet struktury helix-loop v negativně nadšroubovicově vinuté struktuře DNA [69]. Sekvence, které jsou nadměrně zastoupeny ve vazebných místech Dps, mají společný motiv s konsenzem jiných DNA vazebných proteinů, což činí identifikaci specifického motivu velmi problematickou. Může to ukazovat na skutečnost, že Dps se přednostně váže v oblastech, které jsou již obsazeny jinými proteiny. Uvažuje se, že by Dps mohl fungovat jako transkripční faktor, což nebylo dříve vůbec popsáno. Proces může být vysvětlen kompeticí o vazbu na DNA mezi Dps a transkripčními aktivátory/inhibitory. Bez ohledu na mechanismus je už nyní jasné, že koncentrace Dps proteinu ovlivňuje profil transkribovaných mRNA [68].

Ferroxidázová centra jsou umístěna na dimerních rozhraních. Tyto centra katalyzují oxidaci Fe^{2+} peroxidem vodíku na Fe^{3+} , jež je uchováno v dutinách oligomeru Dps. Každé centrum obsahuje dvě vazebná místa pro železo s rozdílnou afinitou, jejíž biochemická podstata je nejasná. Ferroxidázová aktivita je velmi dobře prostudována a příliš se neliší od ostatních ferritinů [70].

YaaA je jedním z důležitých proteinů v odpovědi na stres způsobený peroxidem vodíku. Gen *yaaA* kóduje 29,6 kDa velký cytoplasmatický protein patřící do proteinové rodiny DUF328 [71]. Pro tuto proteinovou rodinu nejsou známy žádné rozpoznatelné motivy či krystalové struktury. YaaA předchází oxidativnímu poškození DNA i proteinů snížením koncentrace volného železa v buňce tím, že utlumí Fentonovu reakci [72]. Geny *yaaA* jsou široce rozšířeny napříč bakteriálním spektrem u aerobních i anaerobních organismů. Jejich výskyt u anaerobně žijících organismů naznačuje, že i tyto organismy se mohou někdy přechodně setkat s oxidativním stresem. Homology YaaA nacházíme i u malého množství eukaryotických organismů, kdy v této skupině případů jsou všechny fotosyntetizující [73].

2.3.1.1 Role metabolismu prolinu v odpovědi na oxidativní stres aktivací OxyR regulonu

Studie z roku 2015 experimentálně prokázala, že kromě získávání energie hraje metabolismus prolinu roli v rezistenci k biotickému i abiotickému stresu u širokého spektra organismů [74]. To se týká i oxidativního stresu, jelikož během metabolické oxidace prolinu dochází ke vzniku peroxidu vodíku, a tudíž k aktivaci regulonu OxyR. Prolin je multifunkční aminokyselina, která zaujímá důležitou roli v metabolismu uhlíku a dusíku. Je využíván jako zdroj uhlíku, dusíku a energie skrze čtyřelektronovou oxidaci L-prolinu na glutamát, která je v gramnegativních bakteriích katalyzována dvěma enzymy PutP a PutA. PutP je transportérem prolinu a PutA je flavoenzymem, který obsahuje prolin dehydrogenázovou (PRODH) a Δ^1 -pyrroline-5-karboxylát dehydrogenázovou doménu (P5CDH) [75].

U *E. coli* má PutA dále N-terminální ribbon-helix-helix (RHH) DNA vazebnou doménu, která umožňuje PutA chovat se jako negativní regulátor transkripce vlastního genu *putA* a genu pro transportér prolinu *putP*. PutA tedy brání též expresi genů *put*. Transkripce těchto genů je aktivována prolinem tak, že oxidovaný prolin způsobí redukci flavinového kofaktoru PutA. Tím dojde k odvázní PutA od DNA a následně k lokalizaci flavoenzymu PutA na membránu a aktivaci prolinové katabolické aktivity [76]. Prolin zlepšuje u *E. coli* toleranci k oxidativnímu stresu, což je závislé na katalytické aktivitě flavoenzymu PutA. Mutanty, kterým *putA* chybí, jsou mnohem citlivější k oxidativnímu stresu než wild-type (wt) kmeny. Bakteriální buňky, ve kterých probíhá metabolismus prolinu, mají zvýšenou expresi genu *katG*, a tudíž detoxifikační katalázovou aktivitu (viz kapitola 2.1) [74]. Důvodem je produkce endogenního peroxidu vodíku během metabolismu prolinu, a tudíž aktivace odpovědi systému OxyR, kterého je gen *katG* součástí. Uvažovalo se, že RHH DNA vazebná doména flavoenzymu PutA by mohla být tím faktorem, který ovlivňuje expresi genu *katG*. Ale vazba PutA na DNA zahrnuje GTTGCA motiv, který nebyl nalezen v promotorové oblasti *katG*, tudíž byla tato hypotéza vyloučena [77].

2.3.2 Regulon SoxRS

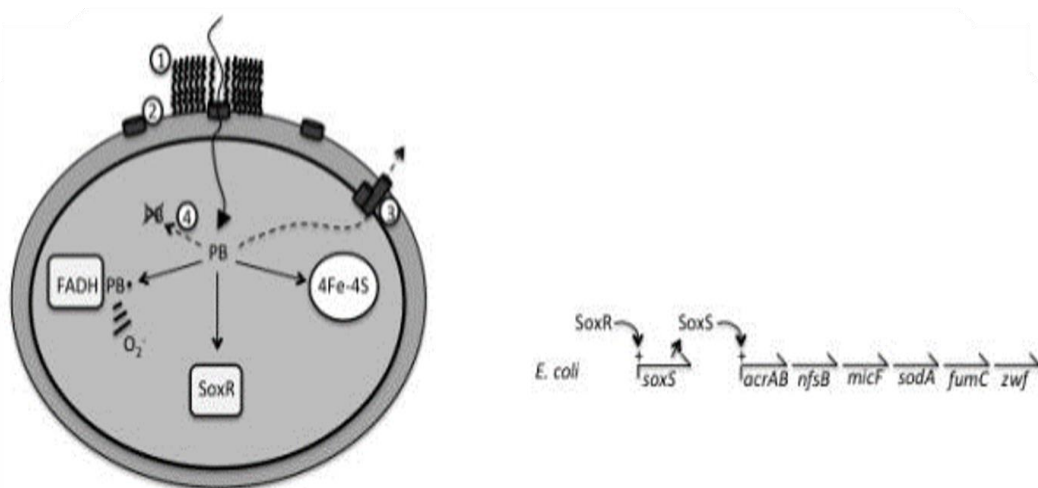
Regulon SoxRS je hlavním adaptačním mechanismem pro stres způsobený superoxidovým radikálem. Hlavními regulátory jsou proteiny SoxRS, jež jsou kódovány geny *soxR* a *soxS*, které jsou u *E. coli* přilehlé a rozdílně přepisované. SoxR je transkripční regulátor patřící do rodiny transkripčních regulátorů MerR. Formuje se v 17 kDa velký homodimer, kde každý monomer obsahuje [2Fe-2S] klastr [78]. Klastr je lokalizován při povrchu proteinu, aby byl superoxidovému radikálu snadno přístupný. Protein SoxR obsahuje DNA vazebnou doménu s helix-turn-helix (HTH) motivem, která je pro proteinovou rodinu MerR běžná [79].

SoxR je konstantně exprimován a ve své redukované formě je protein inaktivní [80]. Oxidace klastru na $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ indukuje transkripci *soxS* genu, který obratem reguluje důležité geny pro odpověď na oxidativní stres [81]. Proces oxidace proteinu SoxR je popsán na obrázku č. 5 (b). Proteiny, které jsou kódovány těmito geny, tvoří dvoustupňový regulační systém. Ve fázi nepřítomnosti indukčního signálu jsou velmi nízké hladiny proteinu SoxS, jelikož k syntéze dochází *de novo* [82].

SoxS je transkripčním aktivátorem proteinové rodiny AraC/XylS, jenž indukuje expresi značného množství genů [81]. Geny aktivované SoxS proteinem zahrnují superoxid dismutázu (*sodA*), enzym pro opravu DNA (*nfo*), ferredoxin (flavodoxin) – NADP(H) reduktázu (*fpr*), represor příjmu železa (*fur*), izoenzymy TCA resistantní k oxidativnímu stresu (*fumC*, *acnA*), opravný enzym pro Fe-S klastry (*yggX*) a efluxní pumpu (*acrAB*) [83]. SoxS negativně reguluje svou vlastní expresi vazbou přebytečného proteinu SoxS do promotorové oblasti genu *soxS*. Při snížení koncentrace superoxidového radikálu je klastr Fe-S proteinu SoxR redukován na NADP(H) závislou reduktázou a protein SoxS podléhá degradaci proteázou Lon [84].

Studie prokázaly, že systém SoxRS může být aktivován i v nepřítomnosti superoxidového radikálu, pokud je narušena redoxní rovnováha buňky [85], což je v souladu s poznatky předchozích prací, které ukázaly, že SoxR nerozpozná přítomnost superoxidového radikálu přímo [86]. Redox-cyklické organické látky (např. chinony a fenaziny) mohou volně procházet biologickou membránou a oxidovat Fe-S klastry proteinu SoxR. Z toho vyplývá, že regulon SoxRS hraje roli v obraně bakteriální buňky také před těmito redox-cyklickými organickými látkami [87, 88]. Toxicita redox-cyklických látek je popsána na obrázku č. 6.

Bylo také prokázáno, že vysoké koncentrace kyslíku aktivují SoxR v nepřítomnosti redox-cyklických látek snížením hladiny NADPH, což vytváří zdroj elektronů pro enzymy, které redukují protein SoxR. V anaerobních podmínkách, například v hostiteli, může být protein SoxR aktivován za přítomnosti dusičnanu, který slouží jako akceptor elektronů v procesu reoxidace redukovaných redox-cyklických látek [85, 89].

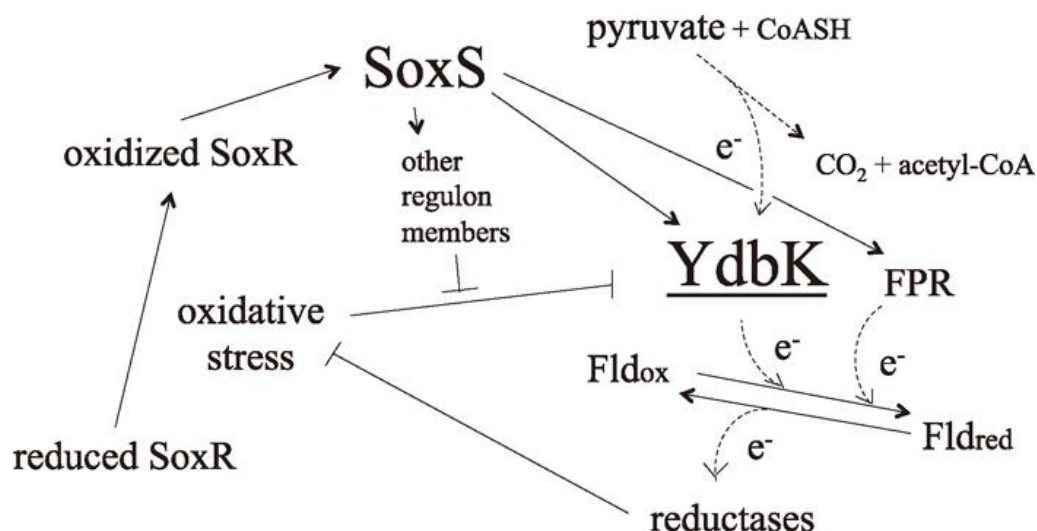


Obrázek č. 6: Toxicita redox-cyklických organických látek

Redox-cyklické látky, jako je plumbagin (PB), katalyzují elektronový transfer z flavoproteinů na kyslík, což přímo poškozuje [4Fe-4S] klastry dehydratáz a oxidací aktivuje protein SoxR. Vyloučení činidla je možné změnou lipopolysacharidové vrstvy (1), inhibicí syntézy porinu (*micF*) (2), vyloučením látky do extracelulárního prostoru (*tolC*, *acrAB*) (3) nebo přeměnou látky na neškodnou (*nfsA*, *ygfZ*) (4). (Převzato z [31] a upraveno)

Protein YdbK je pravděpodobně pyruvát flavodoxin oxidoreduktáza (PFOR), což je enzym, který katalyzuje oxidaci pyruvátu na acetyl-CoA a oxid uhličitý (CO₂) a který dodává elektrony flavodoxinu [90]. Flavodoxin je protein fungující jako přenašeč elektronů, který obsahuje nekovalentně vázaný kofaktor flavinmononukleotid (FMN) jakožto redoxní prosthetickou skupinu. Přenosem elektronů na různé reduktázy dochází k překonání oxidativního stresu a k obnovení redukčního prostředí cytosolu. YdbK udržuje redoxní stav buňky společně s NADP(H) reduktázou (FPR) a účastní se v *E. coli* redukce oxidovaných proteinů včetně SoxR v pozdním stádiu reakce na oxidativní stres. Mutanty s nefunkčním genem *ydbK* jsou extrémně citlivé k superoxidovému stresu. Studie z roku 2013 potvrzuje PFOR aktivitu proteinu YdbK. Exprese genu *ydbK* je spuštěna specifickou vazbou proteinu SoxS do promotorové oblasti [91].

Jiné bakterie (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces coelicolor*) používají protein SoxR odlišným způsobem než *E. coli*. Oxidace SoxR indukuje exkreci endogenních redox-cyklických látek do prostředí, což je součástí kompetiční strategie těchto bakterií [92, 93].



Obrázek č. 7: Model role YdbK v prevenci oxidativního stresu

V podmínkách oxidativního stresu SoxR indukuje expresi *soxS*, který aktivuje expresi genu *ydbK*. Ydbk oxiduje pyruvát a uvolněné elektrony jsou přenášeny přes flavodoxin na různé reduktázy, které obnovují redukční prostředí buňky. "↑" označuje indukci, "T" označuje inhibici indukce. Šipky označují proud elektronů. (Převzato z [91])

2.3.3 Příjem železa a jeho regulace prostřednictvím Fur

Bakteriální buňky vyvinuly komplexní regulační systémy, aby si zajistily dostatečný příjem železa, zabezpečily své fyziologické funkce a zároveň minimalizovaly toxicitu, která je způsobena rolí železa ve Fentonově reakci (viz kapitola 1.2.2) [94]. Dostupnost kyslíku ovlivňuje oxidoredukční stav železa, tedy i způsob, jak je buňkou získáváno. Při nepřítomnosti kyslíku jsou ionty železa ve své rozpustné redukované formě (Fe^{2+}) a mohou být bakterií přijaty přímo transportním systémem FeoABC. V aerobním prostředí je železo přítomno ve své nerozpustné oxidované formě (Fe^{3+}). Proces absorpce zahrnuje syntézu a sekreci chelatačních molekul – siderofor (enterobactin). Transport siderofory s navázaným železitým iontem do cytoplasmy bakteriální buňky zahrnuje specifické transportní systémy ve vnější membráně (TonB-ExbB-ExbD komplex) a ABC transportéry. Transport probíhá za spotřeby energie. V cytoplasmě je železo ze siderofory uvolněno a redukováno na Fe^{2+} [95].

Volné železo v intracelulárním prostoru je snadno oxidovatelné peroxidem vodíku a formuje podle Fentonovy reakce hydroxylový radikál [22, 96]. Homeostatická kontrola hladiny volného železa je důležitá pro minimalizaci oxidativního stresu. Na této kontrole se podílí právě regulátor Fur [97]. Homeostáza železa vyžaduje koordinaci mezi absorpcí, skladováním a

syntézou kofaktorů pro dodávání železa proteinům, které železo obsahují. Na tomto ději se podílí několik transkripčních faktorů. Regulátor Fur má hlavní úlohu v zachování homeostáze železa tím, že přímo vycítí hladinu železnatých iontů a odpovídajícím způsobem mění transkripci příslušných genů. Když jsou železnaté ionty dostupné, tak každá podjednotka dimeru Fur naváže jeden iont [98]. Touto vazbou získá protein Fur dostatečnou afinitu k vazbě na specifickou sekvenci DNA (fur box) a potlačuje transkripci genů pro dráhy příjmu železa. Když je železo limitujícím prvkem, protein Fur se ocitne ve formě bez navázaného železa, tudíž je neaktivní a probíhá exprese genů pro příjem železa [99, 100].

Fur při nadbytku železa přímo reguluje mimo jiné *sodA* (MnSOD), který redukuje vznik hydroxylových radikálů [101, 102]. Fur také nepřímo reguluje *sodB* (FeSOD) a *katG* (HPI) (viz kapitola 2.1) [101]. Nepřímá regulace je zprostředkována přes aktivitu RhyB, což je malá RNA (sRNA), která reguluje 18 operonů s různou funkcí nejen během oxidativního stresu, ale i v TCA, glykolýze, respiraci a ve formaci Fe-S klastrů [103].

Homeostáza železa a odpověď na oxidativní stres jsou propojeny přes regulační interakce. OxyR protein se váže na promotor *fur*. V buňkách, které jsou vystaveny PQ, dochází k indukci delšího transkriptu zahrnujícího gen *fur* a gen *fldA* (kódující flavodoxin), který leží upstream od genu *fur*. Protein SoxS váže *fldA* promotor [104].

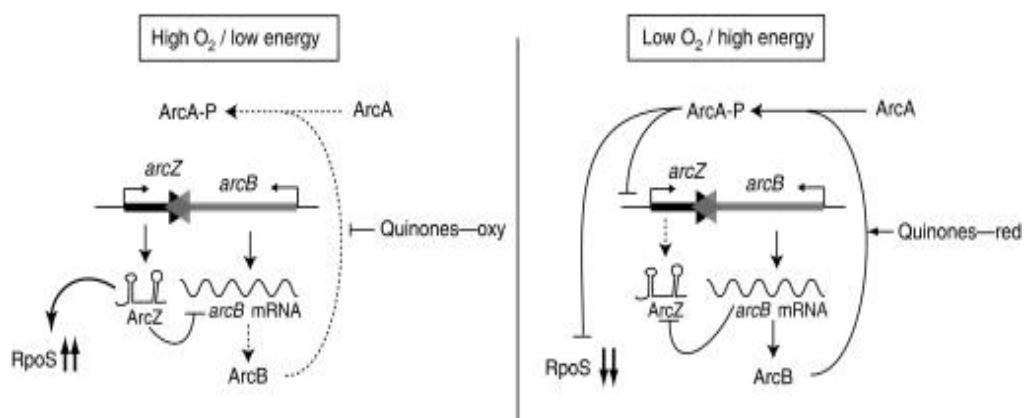
2.3.4 Regulon RpoS

RpoS je transkripčním sigma faktorem obecné stresové odpovědi. Jedná se o 38 kDa velký protein, jenž u bakterií náleží do rodiny 70 sigma faktorů. Sigma faktor je protein, který váže RNA polymerázu (RNAP), čímž se podílí na iniciaci transkripce [105]. Systém RpoS na rozdíl od systémů OxyR a SoxRS není aktivován konformačními změnami, které způsobuje oxidace Fe-S klastrů [106]. RpoS stresová odpověď umožňuje buňkám stát se více rezistentními nejen vůči stresu, se kterým se již setkaly, ale i k jiným stresorům. Když je buňka vystavena neletální dávce stresoru, může tato zkušenost zvýšit její šance na přežití při pozdější expozici letální dávce. Tento fenomén je typickým pro obecné stresové odpovědi a kontrastuje se specifickou odpovědí, která se vypořádá pouze s konkrétním stresorem. RpoS reguluje 10 % genomu *E. coli*, což je přibližně 500 genů [107]. Vstupem do stacionární fáze růstu dochází k podstatnému zvýšení hladiny RpoS. Tento vzestup a pomocné transkripční faktory pomáhají v kompetici s dalšími sigma faktory pro RNAP [108]. Geny, které jsou regulovány systémem RpoS a jsou důležité pro rezistenci k oxidativnímu stresu, zahrnují *Dps* (gen pro DNA vazebný protein z hladovějící buňky), *katE* (HPII), *xthA* (exonukleáza III) a *sodC* (CuZnSOD). *KatE* sice

přispívá k rezistenci k H_2O_2 během exponenciální fáze růstu, ale je hlavní katalázou stacionární fáze [37, 109].

OxyS a ArcZ jsou malé RNA (sRNAs), které mají opačnou úlohu v regulaci hladiny RpoS. *OxyS* je transkribována jako odpověď na aktivaci regulonu OxyR a negativně reguluje translaci *rpoS* [110]. Systém RpoS je využíván v reakci na oxidativní stres pouze ve stacionární fázi buněčného růstu. V exponenciální fázi je preferován regulon OxyR.

ArcZ je sRNA, která je exprimována především ve stacionární fázi růstu bakteriální buňky. Páruje s vlásenkou genu *rpoS* a aktivuje jeho translaci. ArcZ je exprimován pouze v aerobních podmínkách. V anaerobních podmínkách je ArcZ potlačováno expresí ArcA, čímž negativně reguluje translaci genu *rpoS* [111]. Mechanismus regulační dráhy je popsán na obrázku č. 8. Gen *arcZ* se překrývá s genem *arcB* a jejich transkripty se vzájemně negativně ovlivňují. ArcB-P stimuluje degradaci proteinu RpoS proteázou ClpXP. Aby došlo k proteolýze RpoS, musí docházet k interakci s adaptérovým proteinem RssB, který umožňuje rozpoznávání RpoS příslušnou proteázou. Za stresových podmínek je RpoS stabilizován a umožňuje rychlou akumulaci, aby došlo k aktivaci regulonu RpoS. Mechanismy, které vedly ke stabilizaci RpoS během stresu, se nedařilo po mnoho let vysvětlit. Objev tří malých bílkovin (IraP, IraD a IraM), které jsou schopny interagovat s RssB pro stabilizaci RpoS, poskytl příležitost pro poznání regulačních cest, které inhibují proteolýzu RpoS [112].



Obrázek č. 8: Regulační dráha interakce proteinů ArcA, ArcB, a ArcZ. (Převzato z [111])

2.4 Adaptační systémy na úrovni regulace translace

Transkripce genů stresové odpovědi vyžaduje 10 minut, aby dosáhla maximální produkce, a translace proteinů vyžaduje navíc další čas na syntézu, která trvá 20-30 minut. Bakteriální buňky ale potřebují mnohem rychlejší odpověď [113].

Translační systémy mohou odpovídat na náhlé změny prostředí, aby zajistily adaptaci na vzniklý stres dříve, než začnou fungovat více specifické mechanismy (regulony OxyR a SoxRS). V případě eukaryotických buněk jsou tyto systémy velmi dobře prostudovány, ale jen velmi málo je o nich známo v případě prokaryotních organismů. V recentní studii bylo provedeno měření proteosyntézy z celého proteomu *E. coli*, které zjistilo, že syntéza proteinů je v podmínkách oxidativního stresu značně zpomalena. Přesto iniciace translace zůstává nezměněna. Zpomalení procesu translace je způsobeno snížením rychlosti elongační fáze. Též bylo prokázáno, že tento jev je způsoben globální enzymatickou degradací všech druhů tRNA krátce po navození podmínek oxidativního stresu [114]. Tato situace je výhodná, protože tak nedochází ke špatnému sbalení proteinů nebo jinému poškození, které by bylo oxidací způsobeno. Akumulace špatně sbalených proteinů může být pro bakteriální buňku toxická. Oxidativní stres navíc zvyšuje pravděpodobnost inkorporace špatné aminokyseliny poškozením translačního aparátu. Degradace tRNA a zastavení translace tedy zajišťuje kvalitu produkovaných proteinů v podmínkách oxidativního stresu. Po spuštění specifické odpovědi (20-30 min) dojde k obnově hladiny tRNA, čímž dojde k obnově syntézy proteinů. Jde o konzervovaný proces napříč celou živočišnou říší. Obecná odpověď translačního mechanismu u bakterií zůstává zatím nepochopena [114].

2.5 Regulace na úrovni metabolismu

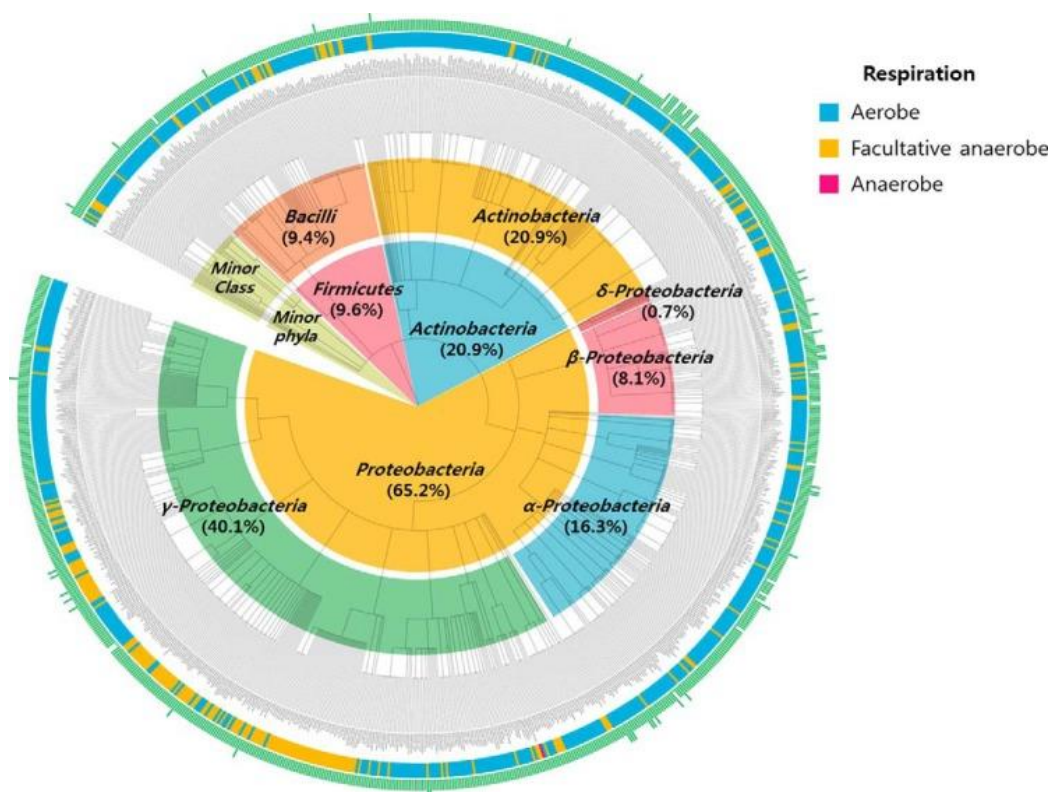
2.5.1 Glyoxylátová zkratka

Ve stresových podmínkách může docházet k preferenci ve prospěch glyoxylátové zkratky (GS), což je dvoukroková metabolická dráha (isocitrát lyáza, *aceA*, a malát syntáza, *aceB*), před plnohodnotným Krebsovým cyklem (TCA). Je známo, že GS je esenciální pro využívání acetátu a mastných kyselin jako zdroje uhlíku ve fyziologických podmínkách, které vyžadují glukoneogenezi. Glukoneogeneze je potřebná zejména v podmínkách limitace uhlíkem [115]. Jedná se o variantu TCA, která sdílí 5 z 8 enzymů. Obchází krok generování oxidu uhličitého, který je katalyzován isocitrát dehydrogenázou a alfa-keto-glutarát dehydrogenázou [116]. Tím, že se obejde TCA, dojde ke konzervaci atomů uhlíku pro

glukoneogenezi, zatímco se snižuje tok elektronů přiváděných do respirace. Produkt genu *aceA* je prvním enzymem GS a katalyzuje formaci glyoxylátu a sukcinátu z isocitrátu. Další reakcí je konverze glyoxylátu na malát a následně proces pokračuje přes malát syntázu, která je u *E. coli* kódovaná genem *aceB* [117].

Pokud je *E. coli* vystavena podmínkám oxidativního stresu, zvyšuje metabolický tok (na 48 %) glyoxylátovým cyklem [118]. GS má potenciální roli v obraně před oxidativním stresem, v resistenci k antibiotikům a patogenezi [119]. Použitím GS se snižuje tok TCA a snižuje se produkce NADH a ATP. V důsledku toho se předpokládá, že použití GS vede ke snížení množství ROS, což přispívá k ochraně bakteriální buňky.

GS tedy představuje atraktivní cíl pro vývoj nových antibiotik především proto, že je hojně rozšířen mezi bakteriemi (fylogenetická distribuce popsána na obrázku č. 9), houbami, protisty a rostlinami, ale chybí u většiny obratlovců [120, 121].



Obrázek č. 9: Fylogenetická distribuce GS v bakteriích

Kladogram popisuje 957 bakteriálních druhů, které mají jak isocitrát lyázu, tak malát syntázu. (Převzato z [119])

3 Alternativní systémy

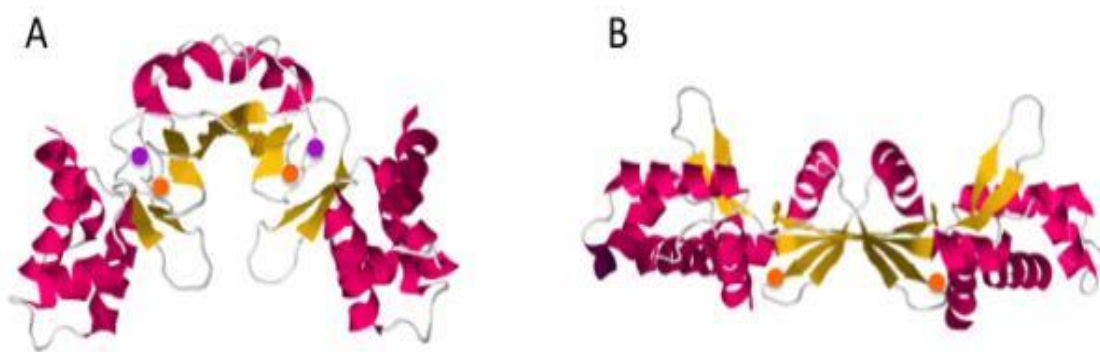
3.1 PerR u *Bacillus subtilis*

PerR je 21 kDA velký protein, tvořící homodimer patřící do proteinové rodiny Fur. PerR protein obsahuje helix-turn-helix (HTH) DNA vazebný motiv na své N-terminální doméně, který je pro členy proteinové rodiny Fur běžný. PerR se váže na DNA do PerR boxu (AAGTATTATTTATTATTATTA). Grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* využívá protein PerR k odpovědi na přítomnost peroxidu vodíku. Pouze forma s navázaným kovem (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) ve své C-terminální doméně se může vázat na DNA a fungovat jako represor. Struktura proteinu je vyobrazena na obrázku č. 10. Stoupne-li hladina peroxidu vodíku, dojde k oxidaci železa navázaného v aktivním místě proteinu PerR. Tím vznikne hydroxylový nebo ferrylový radikál, který oxida histidinové zbytky (H37 nebo H91) na 2-oxo-histidin. Takto modifikované histidinové zbytky ztrácí schopnost vázat železo, které následně difunduje a zanechává za sebou nefunkční apoprotein [122]. Tím protein PerR ztrácí schopnost vázat se na DNA a dojde k transkripci příslušných genů. Regulon PerR sdílí s regulonem OxyR některé geny včetně těch pro katalázu (*katA*), alkyl hydroperoxid reduktázu (*aphCF*), homolog Dps (*MrgA*) a Fur regulátor [123].

Není znám žádný mechanismus redukce 2-oxo-histidinového zbytku, tudíž je tento proces považován za nevratný. Protein PerR může vázat mangan místo železa, pokud ho je v cytoplasmě nadbytek [124]. Protein s navázaným manganem nepodléhá oxidaci, a tudíž nereaguje na přítomnost peroxidu vodíku. Protein PerR tedy slouží také jako senzor hladin železa a manganu. Předpokládá se ale, že hlavní úloha PerR spočívá v zabránění Fentonově reakci [31].

Bylo prokázáno, že oxidovaný protein PerR podléhá degradaci proteázou LonA, což je konzervovaná AAA+ (ATPáza asociovaná s různými buněčnými aktivitami) v širokém spektru bakterií. K degradaci dochází z důvodu ochrany buňky před toxicitou, která by nastala při akumulaci velkého množství nefunkčních proteinů PerR [125].

PerR funguje obdobným způsobem i u dalších bakterií, například u *Staphylococcus aureus* a *Clostridium acetobutylicum* [42].



Obrázek č. 10: Struktura proteinu PerR ve formě s navázaným kovem (A) a bez navázaného kovu (B). Oranžová kolečka představují zinek, fialová kolečka představují mangan. (Převzato z [31])

3.2 OxyR a SoxR u *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.1 Regulátor SoxR

Homology regulátoru SoxR byly identifikovány napříč bakteriálním spektrem, včetně gramnegativní patogenní bakterie *P. aeruginosa*. Avšak očekávaný partner, homolog pro SoxS, identifikován nebyl. Homolog SoxR u *P. aeruginosa* má 62% sekvenční identitu a 77% sekvenční podobnost se SoxR u *E. coli*. Bylo zjištěno, že SoxR aktivuje v odpovědi na superoxidový stres regulon obsahující 6 genů. Geny jsou uspořádány do tří transkripčních jednotek: *mexGHI-ompD*, který kóduje víceúčelový efluxní systém, gen PA3718, kódující efluxní pumpu, a gen PA2274, kódující monooxygenázu s možnou detoxifikační funkcí prostřednictvím oxidace škodlivých xenobiotických sloučenin [126, 127].

Protein SoxR se ve své oxidované formě váže do promotorových oblastí těchto genů, které jsou sekvenčně velmi podobné promotorové oblasti genu *soxS* u *E. coli*. Hlavní úloha SoxR u *P. aeruginosa* pravděpodobně není v reakci na oxidativní stres, jako je tomu u *E. coli*, ale je esenciální pro virulenci [126, 127].

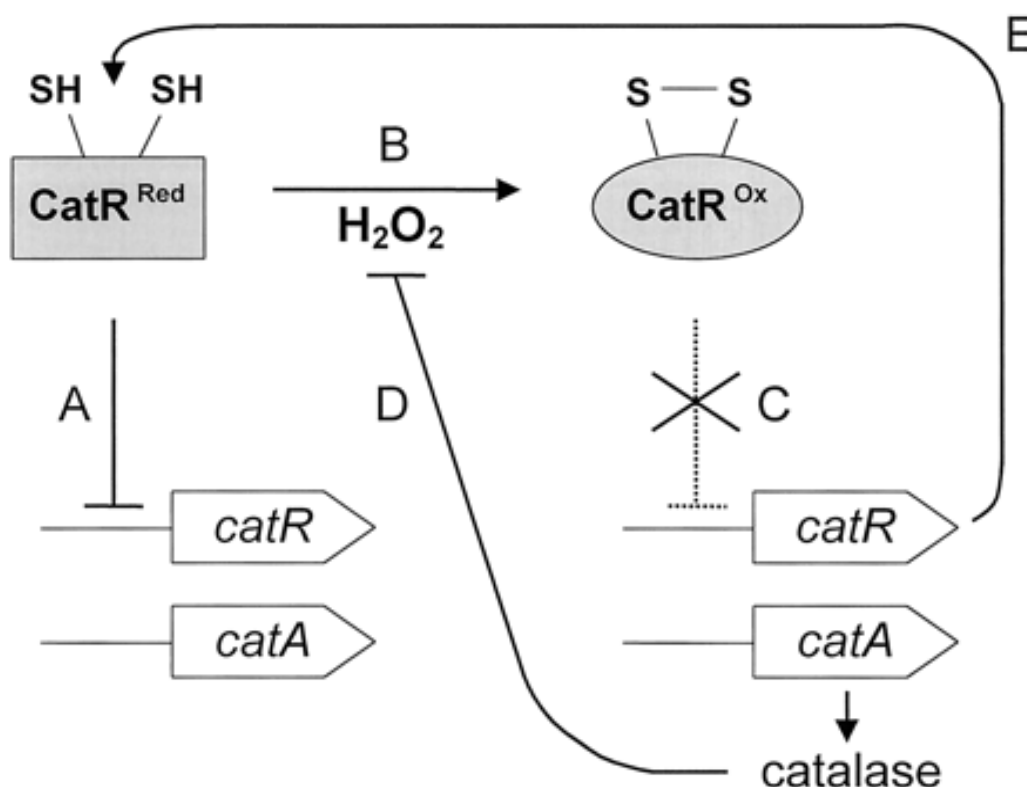
3.2.2 Regulátor OxyR

Zdá se, že OxyR je v *P. aeruginosa* zachován. OxyR aktivuje expresi několika genů pro obranu před oxidativním stresem, například: *katB* (kataláza B), *ahpB* (alkylhydroperoxidáza) a *ahpCF* (alkylhydroperoxidáza) [128].

3.3 CatR u *Streptomyces coelicolor*

S. coelicolor je grampozitivní půdní bakterie, u které byl objeven thiol-redoxní mechanismus detekující přítomnost peroxidu vodíku. Jde o homolog výše popsaného PerR z proteinové rodiny Fur – CatR řídící expresi genu *catA* kódující katalázu A, která je esenciální pro růst buňky v aerobním prostředí. CatR je 15 kDa velký protein, který obsahuje čtyři cysteinové zbytky, jež jsou konzervovány ve většině proteinů typu Fur. Reakcí na stres způsobený peroxidem vodíku je tvorba intramolekulárního disulfidického můstku, který inaktivuje represorovou funkci CatR, čímž se spustí transkripce *catA*. Schéma regulační dráhy CatR je zachyceno na obrázku č. 11.

Byla prokázána přítomnost homologu OxyR, který aktivuje gen *ahpCD* kódující alkyl hydroperoxid reduktázu, avšak nikoliv katalázu, jako je tomu u *E. coli* [42, 129].



Obrázek č. 11: Schéma regulace CatR

Redukovaný protein CatR se váže do promotorové oblasti genů *catA* a *catR*, čímž zabráňuje jejich transkripci (A). Oxidovaná forma proteinu CatR tvoří disulfidické můstky (B), čímž ztrácí afinitu k DNA a spustí se transkripce genů *catA* a *catR* (C). Kataláza CatA inaktivuje peroxid vodíku (D), kdežto CatR zabráňuje další transkripci po odstranění peroxidu vodíku (E). (Převzato z [129])

3.4 FinR a HexR u *Pseudomonas putida*

Odpověď na oxidativní stres u gramnegativní půdní bakterie *P. putida* se výrazně liší od oxidativně stresové odpovědi u *E. coli*. Dva hlavní transkripční regulátory, OxyR a SoxR, jsou přítomné a funkční u *P. putida*. Nicméně nově objevené regulátory FinR a HexR kontrolují několik genů (např. *fpr*, *zwf-1*) patřících do regulátoru SoxR u *E. coli* [130]. Analýza genomu *P. putida* odhalila, že dochází k expresi homologu SoxR (62% identita se SoxR u *E. coli*), ale homolog SoxS chybí. SoxR se u *P. putida* nepodílí na indukci genů oxidativně stresové odpovědi. OxyR u *P. putida* indukuje expresi některých genů oxidativně stresové odpovědi: katalázy (*katA* a *katB*) a alkyl hydroperoxid reduktázu (*ahpC*), jejichž funkční mechanismus byl vysvětlen v kapitole 2.1 [131, 132].

3.4.1 Regulátor FinR

Protein FinR obsahuje 5 cysteinových zbytků, z nichž 3 jsou konzervované (Cys150, Cys239 a Cys289). Tyto cysteinové zbytky se ale nepodílí na aktivaci FinR, jako tomu je u cysteinových zbytků u proteinů SoxR a OxyR u *E. coli*. Protein FinR se dále od SoxR odlišuje nepřítomností Fe^{2+} ve svém aktivním místě. Tyto poznatky naznačují, že FinR má jedinečný aktivační mechanismus, který je velmi odlišný od OxyR a SoxR u *E. coli* [133].

Protein FinR se přímo váže do promotorové oblasti genu *fpr* (ferrodoxin-NADP⁺ reduktáza) při expozici superoxidovému stresu. Ferrodoxin-NADP⁺ reduktázy jsou enzymy, které působí jako mediátory v reverzibilním přenosu elektronů mezi NADP(H) a jednoelektronovými nosiči, jako je ferrodoxin. Když je ferrodoxin redukován aktivitou proteinů Fpr, může předat elektron enzymům, které se účastní řady buněčných dějů včetně obrany před oxidativním stresem [134]. *P. putida* má dva různé typy ferrodoxinových reduktáz: FprA a FprB. FprA je indukován vazbou FinR do příslušné promotorové oblasti v podmínkách oxidativního stresu. FprB je indukován v podmínkách osmotického stresu [135].

3.4.2 Regulátor HexR

Exprese genu *zwf-1* (glukóza-6-fosfát dehydrogenáza; G6PDH) je regulována transkripčním faktorem HexR, který se váže přímo do promotorové oblasti genu *zwf-1*, kde funguje jako represor. Studie naznačují, že HexR reaguje jak na 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát (KDPG), který pravděpodobně může indukovat potlačené geny, tak na oxidativní stres. Úplný mechanismus regulace indukce *zwf-1* v oxidativním stresu zůstává neznámý a je

potřeba dalšího výzkumu. G6PDH se účastní metabolismu glukózy, kde katalyzuje první reakci pentózofostátové dráhy - přeměnu glukózy 6-fosfátu na 6-fosfoglukonát. NADPH, produkovaný aktivitou G6PDH, je esenciální pro redukční metabolické dráhy a opravné reakce při poškození oxidativním stresem. Delece v genu *zwf* značně zvyšuje citlivost bakteriální buňky v oxidativním stresu [136, 137].

Závěr

Cílem této práce bylo popsat bakteriální adaptace na podmínky oxidativního stresu na úrovni regulace transkripce, translace i metabolismu u modelového organismu *E. coli* a tyto poznatky srovnat s adaptačními mechanismy u dalších bakterií – *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas aeruginosa*. Srovnání s jinými bakteriemi představuje důležitou součást této práce, především z hlediska předvídatelnosti regulačních mechanismů, které jsou u *E. coli* velmi dobře prostudované a evolučně konzervované u mnoha bakteriálních druhů.

Adaptace na úrovni regulace translace je prvotní reakcí na podmínky oxidativního stresu. Translační systémy mohou odpovídat na náhlé změny prostředí, aby zajistily adaptaci na vzniklý stres dříve, než začnou fungovat více specifické mechanismy. Specifická odpověď na oxidativní stres zahrnuje regulony OxyR a SoxRS, které fungují na úrovni regulace transkripce příslušných adaptačních genů. Transkripce genů, které jsou pod kontrolou systému OxyR, je esenciální při zvýšených hladinách peroxidu vodíku, který je jedním z reaktivních druhů kyslíku (ROS). Regulon SoxRS je hlavním adaptačním mechanismem pro stres způsobený superoxidovým radikálem. Pro stres způsobený nejreaktivnějším z ROS – hydroxylovým radikálem – nejsou v bakteriální buňce vyvinuty žádné adaptační mechanismy, a proto je důležitá především prevence vzniku tohoto radikálu zabráněním Fentonově reakci. Aktivita transkripčního sigma faktoru obecné stresové odpovědi RpoS je součástí nespecifické adaptace na oxidativní stres pouze ve stacionární fázi růstu buňky. V exponenciální fázi růstu buňky fungují systémy OxyR a SoxRS. V adaptaci na oxidativní stres na úrovni metabolismu je v dnešní době zkoumán glyoxylátový cyklus (GS) jakožto alternativa pro Krebsův cyklus (TCA). Předpokládá se, že tok GS vede ke snížení množství ROS, čímž přispívá k ochraně bakteriální buňky.

Regulační mechanismy na úrovni regulace transkripce u *E. coli* byly hojně studovány již koncem minulého století a recentní studie stále prohlubují poznání složitých regulačních drah. V posledních letech je poukazováno především na další úrovně adaptace na podmínky oxidativního stresu. V centru zájmu je hlavně adaptace na úrovni regulace translace a adaptace na úrovni metabolismu. GS představuje atraktivní cíl pro vývoj nových antibiotik, jelikož je hojně rozšířen mezi bakteriemi, ale u většiny obratlovců chybí.

Během svého dalšího studia se plánuji věnovat vlivu oxidativního stresu na vznik perzistentních variant bakteriálních buněk. Toto téma je v současné době intenzivně zkoumáno. Důvodem je zejména role perzisterů v selhávání terapie chronických infekcí.

Seznam použité literatury

1. Anbar, A.D., *Oceans. Elements and evolution*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1481-3.
2. Gaillard, F., B. Scaillet, and N.T. Arndt, *Atmospheric oxygenation caused by a change in volcanic degassing pressure*. Nature, 2011. **478**(7368): p. 229-32.
3. Case, A.J., *On the Origin of Superoxide Dismutase: An Evolutionary Perspective of Superoxide-Mediated Redox Signaling*. Antioxidants (Basel), 2017. **6**(4).
4. Imlay, J.A., *The mismetallation of enzymes during oxidative stress*. J Biol Chem, 2014. **289**(41): p. 28121-8.
5. Boehm, D.E., K. Vincent, and O.R. Brown, *Oxygen and toxicity inhibition of amino acid biosynthesis*. Nature, 1976. **262**(5567): p. 418-20.
6. Ligeza, A., et al., *Oxygen permeability of thylakoid membranes: electron paramagnetic resonance spin labeling study*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1365**(3): p. 453-63.
7. Fridovich, I., *Oxygen: how do we stand it?* Med Princ Pract, 2013. **22**(2): p. 131-7.
8. Imlay, J.A. and I. Fridovich, *Superoxide production by respiring membranes of Escherichia coli*. Free Radic Res Commun, 1991. **12-13 Pt 1**: p. 59-66.
9. Korshunov, S.S. and J.A. Imlay, *A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria*. Mol Microbiol, 2002. **43**(1): p. 95-106.
10. Liochev, S.L., *The role of iron-sulfur clusters in in vivo hydroxyl radical production*. Free Radic Res, 1996. **25**(5): p. 369-84.
11. Varghese, S., Y. Tang, and J.A. Imlay, *Contrasting sensitivities of Escherichia coli aconitases A and B to oxidation and iron depletion*. J Bacteriol, 2003. **185**(1): p. 221-30.
12. Gu, M. and J.A. Imlay, *Superoxide poisons mononuclear iron enzymes by causing mismetallation*. Mol Microbiol, 2013. **89**(1): p. 123-34.
13. Nachin, L., et al., *SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress*. EMBO J, 2003. **22**(3): p. 427-37.
14. Jang, S. and J.A. Imlay, *Hydrogen peroxide inactivates the Escherichia coli Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate*. Mol Microbiol, 2010. **78**(6): p. 1448-67.
15. Lee, J.H., W.S. Yeo, and J.H. Roe, *Induction of the sufA operon encoding Fe-S assembly proteins by superoxide generators and hydrogen peroxide: involvement of OxyR, IHF and an unidentified oxidant-responsive factor*. Mol Microbiol, 2004. **51**(6): p. 1745-55.
16. Gardner, P.R. and I. Fridovich, *Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase*. J Biol Chem, 1991. **266**(29): p. 19328-33.
17. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *Fumarase C, the stable fumarase of Escherichia coli, is controlled by the soxRS regulon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5892-6.
18. Wallace, M.A., et al., *Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis. Cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32055-62.
19. Gort, A.S., D.M. Ferber, and J.A. Imlay, *The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1999. **32**(1): p. 179-91.
20. Kehres, D.G., et al., *Regulation of Salmonella enterica serovar Typhimurium mntH transcription by H(2)O(2), Fe(2+), and Mn(2+)*. J Bacteriol, 2002. **184**(12): p. 3151-8.
21. Inaoka, T., Y. Matsumura, and T. Tsuchido, *SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1999. **181**(6): p. 1939-43.

22. Imlay, J.A., S.M. Chin, and S. Linn, *Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro*. Science, 1988. **240**(4852): p. 640-2.
23. Anjem, A. and J.A. Imlay, *Mononuclear iron enzymes are primary targets of hydrogen peroxide stress*. J Biol Chem, 2012. **287**(19): p. 15544-56.
24. Sobota, J.M. and J.A. Imlay, *Iron enzyme ribulose-5-phosphate 3-epimerase in Escherichia coli is rapidly damaged by hydrogen peroxide but can be protected by manganese*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(13): p. 5402-7.
25. Hogg, M., S.S. Wallace, and S. Doublie, *Bumps in the road: how replicative DNA polymerases see DNA damage*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(1): p. 86-93.
26. Demple, B., A. Johnson, and D. Fung, *Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(20): p. 7731-5.
27. Jiang, D., et al., *Escherichia coli endonuclease VIII: cloning, sequencing, and overexpression of the nei structural gene and characterization of nei and nei nth mutants*. J Bacteriol, 1997. **179**(11): p. 3773-82.
28. Saito, Y., et al., *Characterization of endonuclease III (nth) and endonuclease VIII (nei) mutants of Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1997. **179**(11): p. 3783-5.
29. Tchou, J., et al., *8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4690-4.
30. Tsaneva, I.R. and B. Weiss, *soxR, a locus governing a superoxide response regulon in Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1990. **172**(8): p. 4197-205.
31. Imlay, J.A., *Transcription Factors That Defend Bacteria Against Reactive Oxygen Species*. Annu Rev Microbiol, 2015. **69**: p. 93-108.
32. Winterbourn, C.C. and A.J. Kettle, *Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(6): p. 642-60.
33. Winterbourn, C.C., *Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 223-7.
34. Gray, M.J., W.Y. Wholey, and U. Jakob, *Bacterial responses to reactive chlorine species*. Annu Rev Microbiol, 2013. **67**: p. 141-60.
35. Winter, J., et al., *Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33*. Mol Cell, 2005. **17**(3): p. 381-92.
36. Winter, J., et al., *Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding*. Cell, 2008. **135**(4): p. 691-701.
37. Barth, E., et al., *Interplay of cellular cAMP levels, {sigma}S activity and oxidative stress resistance in Escherichia coli*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 5): p. 1680-9.
38. Parker, B.W., et al., *The RclR protein is a reactive chlorine-specific transcription factor in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2013. **288**(45): p. 32574-84.
39. Gray, M.J., et al., *NemR is a bleach-sensing transcription factor*. J Biol Chem, 2013. **288**(19): p. 13789-98.
40. Palm, G.J., et al., *Structural insights into the redox-switch mechanism of the MarR/DUF24-type regulator HypR*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(9): p. 4178-92.
41. Drazic, A., et al., *Methionine oxidation activates a transcription factor in response to oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(23): p. 9493-8.
42. Hillion, M. and H. Antelmann, *Thiol-based redox switches in prokaryotes*. Biol Chem, 2015. **396**(5): p. 415-44.

43. Akhova, A.V. and A.G. Tkachenko, *ATP/ADP alteration as a sign of the oxidative stress development in Escherichia coli cells under antibiotic treatment*. FEMS Microbiol Lett, 2014. **353**(1): p. 69-76.
44. Keren, I., et al., *Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species*. Science, 2013. **339**(6124): p. 1213-6.
45. Wu, Y., et al., *Role of oxidative stress in persister tolerance*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(9): p. 4922-6.
46. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
47. Korshunov, S. and J.A. Imlay, *Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2006. **188**(17): p. 6326-34.
48. Benov, L.T. and I. Fridovich, *Escherichia coli expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25310-4.
49. Imlay, J.A. and I. Fridovich, *Assay of metabolic superoxide production in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1991. **266**(11): p. 6957-65.
50. Massé, E. and S. Gottesman, *A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4620-5.
51. Greenberg, J.T., et al., *Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6181-5.
52. Schellhorn, H.E. and H.M. Hassan, *Transcriptional regulation of katE in Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1988. **170**(9): p. 4286-92.
53. Putnam, C.D., et al., *Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism*. J Mol Biol, 2000. **296**(1): p. 295-309.
54. Imlay, J.A., *The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(7): p. 443-54.
55. Snel, B., P. Bork, and M.A. Huynen, *Genomes in flux: the evolution of archaeal and proteobacterial gene content*. Genome Res, 2002. **12**(1): p. 17-25.
56. Chiang, S.M. and H.E. Schellhorn, *Regulators of oxidative stress response genes in Escherichia coli and their functional conservation in bacteria*. Arch Biochem Biophys, 2012. **525**(2): p. 161-9.
57. Kullik, I., et al., *Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization*. J Bacteriol, 1995. **177**(5): p. 1285-91.
58. Storz, G., L.A. Tartaglia, and B.N. Ames, *Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation*. Science, 1990. **248**(4952): p. 189-94.
59. Choi, H., et al., *Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor*. Cell, 2001. **105**(1): p. 103-13.
60. Toledano, M.B., et al., *Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection*. Cell, 1994. **78**(5): p. 897-909.
61. Tao, K., N. Fujita, and A. Ishihama, *Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein*. Mol Microbiol, 1993. **7**(6): p. 859-64.
62. Zheng, M., F. Aslund, and G. Storz, *Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation*. Science, 1998. **279**(5357): p. 1718-21.
63. Frenkiel-Krispin, D., et al., *Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria*. Mol Microbiol, 2004. **51**(2): p. 395-405.

64. Karas, V.O., I. Westerlaken, and A.S. Meyer, *The DNA-Binding Protein from Starved Cells (Dps) Utilizes Dual Functions To Defend Cells against Multiple Stresses*. J Bacteriol, 2015. **197**(19): p. 3206-15.
65. Chiancone, E. and P. Ceci, *The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1800**(8): p. 798-805.
66. Altuvia, S., et al., *The dps promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase*. Mol Microbiol, 1994. **13**(2): p. 265-72.
67. Nair, S. and S.E. Finkel, *Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase*. J Bacteriol, 2004. **186**(13): p. 4192-8.
68. Antipov, S.S., et al., *The nucleoid protein Dps binds genomic DNA of Escherichia coli in a non-random manner*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0182800.
69. Melekhov, V.V., et al., *Modes of Escherichia coli Dps Interaction with DNA as Revealed by Atomic Force Microscopy*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126504.
70. Zhao, G., et al., *Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of Escherichia coli*. J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 27689-96.
71. Finn, R.D., et al., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D211-22.
72. Zheng, M., et al., *DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the Escherichia coli response to hydrogen peroxide*. J Bacteriol, 2001. **183**(15): p. 4562-70.
73. Liu, Y., S.C. Bauer, and J.A. Imlay, *The YaaA protein of the Escherichia coli OxyR regulon lessens hydrogen peroxide toxicity by diminishing the amount of intracellular unincorporated iron*. J Bacteriol, 2011. **193**(9): p. 2186-96.
74. Zhang, L., J.R. Alfano, and D.F. Becker, *Proline metabolism increases katG expression and oxidative stress resistance in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2015. **197**(3): p. 431-40.
75. Tanner, J.J., *Structural biology of proline catabolism*. Amino Acids, 2008. **35**(4): p. 719-30.
76. Gu, D., et al., *Identification and characterization of the DNA-binding domain of the multifunctional PutA flavoenzyme*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31171-6.
77. Zhou, Y., et al., *Structural basis of the transcriptional regulation of the proline utilization regulon by multifunctional PutA*. J Mol Biol, 2008. **381**(1): p. 174-88.
78. Hidalgo, E., et al., *Binuclear [2Fe-2S] clusters in the Escherichia coli SoxR protein and role of the metal centers in transcription*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 20908-14.
79. Watanabe, S., et al., *Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4121-6.
80. Li, Z. and B. Dimple, *SoxS, an activator of superoxide stress genes in Escherichia coli. Purification and interaction with DNA*. J Biol Chem, 1994. **269**(28): p. 18371-7.
81. Wu, J. and B. Weiss, *Two divergently transcribed genes, soxR and soxS, control a superoxide response regulon of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1991. **173**(9): p. 2864-71.
82. Nunoshiba, T., et al., *Two-stage control of an oxidative stress regulon: the Escherichia coli SoxR protein triggers redox-inducible expression of the soxS regulatory gene*. J Bacteriol, 1992. **174**(19): p. 6054-60.
83. Rosner, J.L., et al., *Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyridyl in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2002. **184**(5): p. 1407-16.
84. Griffith, K.L., I.M. Shah, and R.E. Wolf, *Proteolytic degradation of Escherichia coli transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the*

- superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons*. Mol Microbiol, 2004. **51**(6): p. 1801-16.
85. Gu, M. and J.A. Imlay, *The SoxRS response of Escherichia coli is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide*. Mol Microbiol, 2011. **79**(5): p. 1136-50.
 86. Gort, A.S. and J.A. Imlay, *Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses*. J Bacteriol, 1998. **180**(6): p. 1402-10.
 87. de Paiva, S.R., et al., *Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from Plumbago species*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003. **98**(7): p. 959-61.
 88. Hassan, H.M. and I. Fridovich, *Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1978. **253**(22): p. 8143-8.
 89. Krapp, A.R., M.V. Humbert, and N. Carrillo, *The soxRS response of Escherichia coli can be induced in the absence of oxidative stress and oxygen by modulation of NADPH content*. Microbiology, 2011. **157**(Pt 4): p. 957-65.
 90. Serres, M.H., et al., *A functional update of the Escherichia coli K-12 genome*. Genome Biol, 2001. **2**(9): p. RESEARCH0035.
 91. Nakayama, T., et al., *Escherichia coli pyruvate:flavodoxin oxidoreductase, YdbK - regulation of expression and biological roles in protection against oxidative stress*. Genes Genet Syst, 2013. **88**(3): p. 175-88.
 92. Wang, Y., S.E. Kern, and D.K. Newman, *Endogenous phenazine antibiotics promote anaerobic survival of Pseudomonas aeruginosa via extracellular electron transfer*. J Bacteriol, 2010. **192**(1): p. 365-9.
 93. Wang, Y., et al., *Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition*. J Bacteriol, 2011. **193**(14): p. 3606-17.
 94. Andrews, S., et al., *Control of iron metabolism in bacteria*. Met Ions Life Sci, 2013. **12**: p. 203-39.
 95. Beauchene, N.A., et al., *O*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(46): p. 12261-12266.
 96. Imlay, J.A., *Pathways of oxidative damage*. Annu Rev Microbiol, 2003. **57**: p. 395-418.
 97. Mills, S.A. and M.A. Marletta, *Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the ferric uptake regulator from Escherichia coli*. Biochemistry, 2005. **44**(41): p. 13553-9.
 98. Fillat, M.F., *The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators*. Arch Biochem Biophys, 2014. **546**: p. 41-52.
 99. Baichoo, N. and J.D. Helmann, *Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence*. J Bacteriol, 2002. **184**(21): p. 5826-32.
 100. Lavrrar, J.L. and M.A. McIntosh, *Architecture of a fur binding site: a comparative analysis*. J Bacteriol, 2003. **185**(7): p. 2194-202.
 101. Niederhoffer, E.C., et al., *Control of Escherichia coli superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus*. J Bacteriol, 1990. **172**(4): p. 1930-8.
 102. Tardat, B. and D. Touati, *Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in Escherichia coli::Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic respiration control)*. Mol Microbiol, 1991. **5**(2): p. 455-65.
 103. Massé, E., C.K. Vanderpool, and S. Gottesman, *Effect of RyhB small RNA on global iron use in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2005. **187**(20): p. 6962-71.
 104. Zheng, M., et al., *OxyR and SoxRS regulation of fur*. J Bacteriol, 1999. **181**(15): p. 4639-43.
 105. Lonetto, M., M. Gribskov, and C.A. Gross, *The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships*. J Bacteriol, 1992. **174**(12): p. 3843-9.

106. Jishage, M., et al., *Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in Escherichia coli: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions*. J Bacteriol, 1996. **178**(18): p. 5447-51.
107. Weber, H., et al., *Genome-wide analysis of the general stress response network in Escherichia coli: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity*. J Bacteriol, 2005. **187**(5): p. 1591-603.
108. Farewell, A., K. Kvint, and T. Nyström, *Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition*. Mol Microbiol, 1998. **29**(4): p. 1039-51.
109. González-Flecha, B. and B. Dimple, *Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing Escherichia coli*. J Bacteriol, 1997. **179**(2): p. 382-8.
110. Zhang, A., et al., *The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein*. EMBO J, 1998. **17**(20): p. 6061-8.
111. Mandin, P. and S. Gottesman, *Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA*. EMBO J, 2010. **29**(18): p. 3094-107.
112. Bougdour, A., et al., *Multiple pathways for regulation of sigmaS (RpoS) stability in Escherichia coli via the action of multiple anti-adaptors*. Mol Microbiol, 2008. **68**(2): p. 298-313.
113. Lackner, D.H., et al., *Regulation of transcriptome, translation, and proteome in response to environmental stress in fission yeast*. Genome Biol, 2012. **13**(4): p. R25.
114. Zhong, J., et al., *Transfer RNAs Mediate the Rapid Adaptation of Escherichia coli to Oxidative Stress*. PLoS Genet, 2015. **11**(6): p. e1005302.
115. Maloy, S.R., M. Bohlander, and W.D. Nunn, *Elevated levels of glyoxylate shunt enzymes in Escherichia coli strains constitutive for fatty acid degradation*. J Bacteriol, 1980. **143**(2): p. 720-5.
116. Kornberg, H.L., *The role and control of the glyoxylate cycle in Escherichia coli*. Biochem J, 1966. **99**(1): p. 1-11.
117. Ikeda, T. and D.C. LaPorte, *Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase: aceK alleles that express kinase but not phosphatase activity*. J Bacteriol, 1991. **173**(5): p. 1801-6.
118. Rui, B., et al., *A systematic investigation of Escherichia coli central carbon metabolism in response to superoxide stress*. BMC Syst Biol, 2010. **4**: p. 122.
119. Ahn, S., et al., *Role of Glyoxylate Shunt in Oxidative Stress Response*. J Biol Chem, 2016. **291**(22): p. 11928-38.
120. Vanni, P., et al., *Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme*. Comp Biochem Physiol B, 1990. **95**(3): p. 431-58.
121. Cabral, D.J., J.I. Wurster, and P. Belenky, *Antibiotic Persistence as a Metabolic Adaptation: Stress, Metabolism, the Host, and New Directions*. Pharmaceuticals (Basel), 2018. **11**(1).
122. Lee, J.W. and J.D. Helmann, *The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 363-7.
123. Bsat, N., et al., *Bacillus subtilis contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors*. Mol Microbiol, 1998. **29**(1): p. 189-98.
124. Chen, L., L. Keramati, and J.D. Helmann, *Coordinate regulation of Bacillus subtilis peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8190-4.
125. Ahn, B.E. and T.A. Baker, *Oxidization without substrate unfolding triggers proteolysis of the peroxide-sensor, PerR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(1): p. E23-31.
126. Ha, U. and S. Jin, *Expression of the soxR gene of Pseudomonas aeruginosa is inducible during infection of burn wounds in mice and is required to cause efficient bacteremia*. Infect Immun, 1999. **67**(10): p. 5324-31.

127. Palma, M., et al., *Pseudomonas aeruginosa SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response*. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 2958-66.
128. Ochsner, U.A., et al., *Role of the Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF*. J Bacteriol, 2000. **182**(16): p. 4533-44.
129. Hahn, J.S., et al., *H₂O₂-sensitive fur-like repressor CatR regulating the major catalase gene in Streptomyces coelicolor*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38254-60.
130. Park, W., et al., *Regulation of superoxide stress in Pseudomonas putida KT2440 is different from the SoxR paradigm in Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(1): p. 51-6.
131. Hishinuma, S., et al., *OxyR regulated the expression of two major catalases, KatA and KatB, along with peroxiredoxin, AhpC in Pseudomonas putida*. Environ Microbiol, 2006. **8**(12): p. 2115-24.
132. Hishinuma, S., et al., *OxyR is involved in the expression of thioredoxin reductase TrxB in Pseudomonas putida*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **289**(2): p. 138-45.
133. Yeom, S., J. Yeom, and W. Park, *Molecular characterization of FinR, a novel redox-sensing transcriptional regulator in Pseudomonas putida KT2440*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 5): p. 1487-96.
134. Yeom, J., et al., *Ferredoxin-NADP⁺ reductase from Pseudomonas putida functions as a ferric reductase*. J Bacteriol, 2009. **191**(5): p. 1472-9.
135. Lee, Y., et al., *Molecular characterization of fprB (ferredoxin-NADP⁺ reductase) in Pseudomonas putida KT2440*. J Microbiol Biotechnol, 2007. **17**(9): p. 1504-12.
136. Kim, J., C.O. Jeon, and W. Park, *Dual regulation of zwf-1 by both 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate and oxidative stress in Pseudomonas putida*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 12): p. 3905-16.
137. Bojanovič, K., I. D'Arrigo, and K.S. Long, *Global Transcriptional Responses to Osmotic, Oxidative, and Imipenem Stress Conditions in Pseudomonas putida*. Appl Environ Microbiol, 2017. **83**(7).